



Antagonisme de lactococcus garvieae vis-à-vis de Staphylococcus aureus : étude physiologique et transcriptomique des mécanismes

Pierre Delpech

► To cite this version:

Pierre Delpech. Antagonisme de lactococcus garvieae vis-à-vis de Staphylococcus aureus : étude physiologique et transcriptomique des mécanismes. Alimentation et Nutrition. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2015. Français. NNT : 2015CLF22615 . tel-01267566

HAL Id: tel-01267566

<https://theses.hal.science/tel-01267566>

Submitted on 4 Feb 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

***ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE,
SANTÉ, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT***

N° d'ordre 676

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

(SPÉCIALITÉ : NUTRITION ET SCIENCES DES ALIMENTS)

soutenue le 10 novembre 2015

PIERRE DELPECH

***Antagonisme de *Lactococcus garvieae* vis-à-vis de
Staphylococcus aureus : étude physiologique
et transcriptomique des mécanismes***

Directrice de thèse : Mme Marie-Christine MONTEL, DR à l'INRA d'Aurillac
Présidente du jury : Mme Anne-Marie DELORT, DR à l'ICCF de Clermont-Ferrand
Membres : Mme Stéphanie BORNES, MCF à l'UdA, IUT d'Aurillac
Mme Céline DELBES, CR à l'INRA d'Aurillac
M. Yves LE LOIR, DR à l'INRA de Rennes
Rapporteuses : Mme Marie-Line DAVERAN-MINGOT, MCF à l'UPS /
INSA de Toulouse
Mme Monique ZAGOREC, DR à l'INRA de Nantes

Unité de Recherches Fromagères (UR 545, INRA) et
Laboratoire de Biologie (Université d'Auvergne, Antenne d'Aurillac)

REMERCIEMENTS PERSONNELS

Je tiens à débiter cette longue liste de remerciements par ceux allant à mes deux tutrices, Stéphanie Bornes et Céline Delbès, pour leur suivi quotidien, leurs conseils, leur soutien moral, leur positivité et leur bonne humeur, qui m'ont pleinement épaulé durant ces trois années de thèse. Je remercie également ma directrice de thèse, Marie-Christine Montel, pour son expérience et ses précieux conseils. Et bien entendu, je remercie tous les membres de l'Unité de Recherches Fromagères, du Laboratoire de Biologie de l'IUT et du Pôle Fromager que j'ai pris un grand plaisir à côtoyer quotidiennement et qui ont eu à supporter mes (mauvaises) blagues durant 3 ans !

J'adresse également ma gratitude aux membres du jury, Anne-Marie Delort et Yves Le Loir, qui en plus de mes deux tutrices ont accepté d'examiner mes travaux de thèse, et particulièrement aux deux rapporteuses, Marie-Line Daveran-Mingot et Monique Zagorec, pour leur relecture du manuscrit et les conseils qui en ont découlé. Un grand merci, aussi, aux membres des comités de thèse pour leurs conseils et les discussions scientifiques régulières, riches et intéressantes que nous avons eu et qui ont fait évoluer le sujet.

Je remercie ensuite tous les amis qui ont pu m'épauler moralement durant ces trois années de thèse, notamment Ludo, Seb et Benoît qui me supportent depuis de nombreuses années maintenant, mais aussi Alix, Stevie, Elise et les autres étudiants MABS avec lesquels j'ai pu sympathiser durant mes études. Je remercie plus particulièrement les acteurs de ma vie aurillacoise avec qui j'ai pu m'amuser et me changer les idées très régulièrement (et c'était parfois bienvenu !) : Adrian, Rémy, Thomas, Perrine, Marie, Alexia, Mélanie, Etienne et Jacky (même s'il paraît qu'il s'appelle Pierre, en vrai).

Je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude à ma famille proche sans qui je ne serai pas qui je suis aujourd'hui, mes parents à qui je dois tellement de choses que je ne pourrai jamais toutes les lister, mais aussi mon frère et mes grands-parents. J'ai une pensée plus particulière pour mon grand-père maternel qui a toujours eu le mot pour me féliciter et m'encourager durant mes études et qui nous a malheureusement quittés quelques mois avant la fin de cette thèse.

Enfin, je terminerai ces remerciements par celle qui m'a épaulé, soutenu et encouragé quotidiennement et inconditionnellement, et sans qui je n'aurais pas pu surmonter les épreuves diverses que j'ai pu traverser durant cette thèse avec moins de difficultés, ma compagne Egny.

PARTENAIRES

Je remercie également les institutions et structures ayant financé cette thèse, le Fonds Européen pour le Développement Régional (FEDER) en Auvergne et le Conseil Régional d'Auvergne. Un autre grand merci au cluster IRP (Institut de la Recherche Pharmabiotique) et aux partenaires industriels pour leur intérêt et leur soutien vis-à-vis de ce projet : Biovitis, Probionov (depuis peu : biose) et LALLEMAND.



- SOMMAIRE -

AVANT-PROPOS	17
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	19
<i>I. Activités antagonistes des bactéries lactiques vis-à-vis de Staphylococcus aureus : principaux facteurs biotiques et abiotiques mis en jeu</i>	
I.1. Ratio entre la souche antagoniste et le pathogène	20
I.2. Production d'acides organiques et acidification du milieu	21
I.3. Compétition nutritionnelle.....	21
I.4. Bactériocines	22
I.5. ROS et peroxyde d'hydrogène.....	24
<i>II. Inhibition de S. aureus par L. garvieae : un modèle de relation antagoniste entre une bactérie lactique et un pathogène</i>	
II.1. <i>Lactococcus garvieae</i> , un agent au potentiel biopréservateur	25
II.1.1. Caractéristiques principales de <i>L. garvieae</i>	26
II.1.2. Limites à l'utilisation de <i>L. garvieae</i> en tant qu'agent biopréservateur	27
II.1.2.1. Entre souche pathogène, opportuniste et commensale.....	27
II.1.2.1.1. Lactococcose d'espèces aquatiques.....	27
II.1.2.1.2. Mammites d'espèces laitières.....	29
II.1.2.1.3. Un pathogène opportuniste de l'Homme ?	30
II.1.2.1.4. Mécanismes de virulence.....	30
II.1.2.2. Inhibition par d'autres bactéries	31
II.1.2.3. Effet toxique du H ₂ O ₂ pour l'Homme	32
II.1.3. Intérêt biotechnologique de <i>L. garvieae</i>	32
II.1.3.1. Ubiquité dans les produits laitiers	32
II.1.3.2. Potentiel biotechnologique	33
II.1.3.3. Spectre d'action inhibitrice.....	34
II.2. Contrôle de la croissance et de la virulence de <i>S. aureus</i> : intérêt des cultures protectrices	34
II.2.1. Caractéristiques principales de <i>S. aureus</i>	34
II.2.2. Pathogénicité de <i>S. aureus</i> pour l'Homme	35
II.2.3. Facteurs de virulence staphylococciques	37
II.2.3.1. Superantigènes	37
II.2.3.1.1. Entérotoxines.....	38
II.2.3.1.2. Toxic Shock Syndrom Toxin 1 (TSST-1).....	39
II.2.3.2. Autres facteurs de virulence principaux.....	40
II.2.4. Contrôle de la virulence et de la croissance de <i>S. aureus</i> dans l'alimentation.....	40
II.3. Facteurs biotiques et abiotiques impliqués dans l'antagonisme de <i>L. garvieae</i> contre <i>S. aureus</i>	42
<i>III. Mécanismes moléculaires potentiellement impliqués dans l'interaction entre S. aureus et L. garvieae</i>	
III.1. Métabolisme et voie du peroxyde d'hydrogène	44
III.1.1. Consommation du O ₂ et production de H ₂ O ₂	44

III.1.1.1. Acteurs moléculaires impliqués dans la consommation du O ₂ et la production du H ₂ O ₂	45
III.1.1.1.1. NADH oxydases (NOX).....	45
III.1.1.1.2. Chaîne respiratoire.....	46
III.1.1.1.3. SuperOxyde Dismutases (SOD)	48
III.1.1.1.4. Pyruvate Oxydases (POX)	49
III.1.1.1.5. Monooxygénases	49
III.1.1.1.6. Autres	50
III.1.1.2. Effet de l'interaction bactérienne, de l'aération et de la présence de H ₂ O ₂ sur les mécanismes de consommation de O ₂ et de production de H ₂ O ₂ de bactéries lactiques et de <i>S. aureus</i>	50
III.1.2. Résistance et dégradation des peroxydes organiques (et spécialement H ₂ O ₂).....	52
III.1.2.1. Acteurs moléculaires impliqués dans la dégradation des peroxydes.....	52
III.1.2.1.1. Catalase (Kat)	52
III.1.2.1.2. Peroxyrédoxines et systèmes régénérateurs.....	53
III.1.2.1.2.1. Peroxyrédoxine AhpR	54
III.1.2.1.2.2. Thiorédoxines (TrxA) et thiorédoxine réductase (TrxB)	54
III.1.2.1.2.3. Glutarédoxines (Grx) et glutarédoxine réductase	54
III.1.2.1.2.4. Glutathion peroxydase.....	55
III.1.2.1.3. Protéines de la famille Ohr / OsmC.....	55
III.1.2.2. Effet de l'interaction bactérienne, de l'aération et de la présence de H ₂ O ₂ sur les mécanismes de dégradation des peroxydes de bactéries lactiques et de <i>S. aureus</i>	56
III.2. Réponse au stress oxydatif.....	57
III.2.1. Protéines chaperonnes	59
III.2.1.1. Chaperonines.....	59
III.2.1.2. Chaperonnes de l'ARN	60
III.2.1.3. Effet de l'interaction bactérienne, de l'aération, de la présence de H ₂ O ₂ et de la température sur l'expression des protéines chaperonnes de bactéries lactiques et de <i>S. aureus</i>	60
III.2.2. Complexe protéolytique Clp	61
III.2.2.1. Protéines et rôle des protéines Clp	61
III.2.2.2. Effet de l'interaction bactérienne, de l'aération, de la présence de H ₂ O ₂ et de la température sur l'expression des protéases et ATPases Clp de bactéries lactiques et de <i>S. aureus</i>	63
III.2.3. Réponse SOS	64
III.2.4. Régulateurs de la réponse au stress	65
III.2.4.1. Régulateur des gènes de classe I : HrcA	65
III.2.4.2. Régulateur des gènes de classe II : σ^B	66
III.2.4.3. Régulateur des gènes de classe III : CtsR	66
III.2.4.4. Autres régulateurs potentiels.....	67
III.2.4.5. Effet de l'interaction bactérienne, de l'aération, de la présence de H ₂ O ₂ et de la température sur l'expression des régulateurs de la réponse au stress de bactéries lactiques et de <i>S. aureus</i>	68
III.3. Autres mécanismes potentiellement impliqués dans l'inhibition de <i>S. aureus</i>	69
III.3.1. Compétition nutritionnelle	69
III.3.2. Homéostasie en métaux	69
III.3.3. Division cellulaire de <i>S. aureus</i>	70
III.3.4. Bactériocines.....	72

III.3.5. Localisation de l'effecteur	72
III.4. Régulation de la virulence de <i>S. aureus</i>	73
IV. Conclusion de l'étude bibliographique et stratégie choisie pour l'étude de l'antagonisme de <i>L. garvieae</i> vis-à-vis de <i>S. aureus</i>	76
METHODOLOGIE.....	79
I. Paramètres généraux des expérimentations en culture	80
I.1. Souches et génomes disponibles	81
I.2. Bouillons de culture et milieux solides utilisés	81
I.3. Précultures	81
I.4. Choix des paramètres	82
II. Suivi de l'évolution de la croissance de <i>S. aureus</i> et <i>L. garvieae</i> et de la concentration en peroxyde d'hydrogène au cours du temps.....	82
II.1. Suivi de croissance des souches bactériennes.....	83
II.2. Mesure de la concentration en H ₂ O ₂ dans les cultures	83
III. Détermination de la réponse de <i>S. aureus</i> à son inhibition par <i>L. garvieae</i>	84
III.1. Approche génomique (partie I).....	84
III.1.1. Séquençage de la souche <i>S. aureus</i> SA15	84
III.1.2. Recherche de gènes de <i>S. aureus</i> potentiellement impliqués dans l'inhibition par <i>L. garvieae</i>	85
III.1.3. Recherche de gènes de <i>S. aureus</i> SA15 et MW2 uniquement identifiés dans l'une des deux souches	85
III.2. Approche phénotypique (partie III)	86
III.2.1. Détermination de la vitesse d'élimination du H ₂ O ₂	86
IV. Détermination des mécanismes de <i>L. garvieae</i> impliqués dans l'antagonisme vis-à-vis de <i>S. aureus</i>	86
IV.1. Approche génomique (partie I)	87
IV.1.1. Séquençage de la souche <i>L. garvieae</i> N201	87
IV.1.2. Recherche de gènes de <i>L. garvieae</i> N201 potentiellement impliqués dans l'antagonisme vis-à-vis de <i>S. aureus</i>	87
IV.1.3. Recherche de bactériocines dans le génome de <i>L. garvieae</i> N201	87
IV.1.3. Détermination de gènes de virulence potentiels de <i>L. garvieae</i> N201, Lg2, <i>L. lactis</i> II1403, <i>Streptococcus pneumoniae</i> R6, <i>S. aureus</i> SA15 et MW2	88
IV.2. Approche transcriptomique (partie II).....	88
IV.2.1. Préparation des échantillons en vue du RNA sequencing.....	88
IV.3. Approche phénotypique (partie III)	89
IV.3.1. Détermination du potentiel d'oxydo-réduction dans les cultures de <i>L. garvieae</i> N201 et <i>S. aureus</i> SA15	89
IV.3.2. Effet d'un surnageant de co-culture sur la croissance de <i>S. aureus</i> en bouillon de culture.....	89
RESULTATS.....	91
CHAPITRE 1: Croissance de <i>S. aureus</i> et <i>L. garvieae</i> en interaction sous différents niveaux d'aération	93
I.1. Matériel et méthodes.....	95
I.2. Résultats	95
I.3. Conclusion	97

CHAPITRE 2 : Réponse de <i>S. aureus</i> à l'inhibition de croissance causée par <i>L. garvieae</i>	99
<i>PARTIE I : APPROCHE GENOMIQUE</i>	101
I.1. Matériel et méthodes	101
I.2. Résultats	101
I.3. Conclusion	104
<i>PARTIE II : APPROCHE TRANSCRIPTOMIQUE</i>	105
II.1. Matériel et méthodes	105
II.2. Résultats	105
I.3. Conclusion	106
<i>PARTIE III : APPROCHE PHENOTYPIQUE</i>	107
III.1. Matériel et méthodes	107
III.2. Résultats	107
III.2.1. Hypothèse 1 : vitesse d'élimination du H ₂ O ₂	107
III.2.1. Hypothèse 2 : survie en présence de H ₂ O ₂	108
I.3. Conclusion	108
<i>Bilan du Chapitre 2</i>	109
<i>Article n°1 : Staphylococcus aureus transcriptomic response to inhibition by H₂O₂-producing Lactococcus garvieae</i>	110
CHAPITRE 3 : Détermination des mécanismes de <i>L. garvieae</i> N201 impliqués dans l'antagonisme contre <i>S. aureus</i>	119
<i>PARTIE I : APPROCHE GENOMIQUE</i>	121
I.1. Matériel et méthodes	121
I.2. Résultats	121
I.2.1. Identification de gènes potentiellement impliqués dans l'inhibition de <i>S. aureus</i>	121
I.2.2. Détermination des gènes de virulence potentiels de <i>L. garvieae</i> N201	124
I.3. Conclusion	125
<i>Article n°2 (genome announcement) : Genome sequence of Lactococcus garvieae N201 isolated from Saint-Nectaire cheese and showing anti-staphylococcal activities</i>	126
<i>PARTIE II : APPROCHE TRANSCRIPTOMIQUE</i>	129
II.1. Matériel et méthodes	129
II.2. Résultats	129
I.3. Conclusion	132
<i>PARTIE III : APPROCHE PHENOTYPIQUE</i>	133
II.1. Matériel et méthodes	133
II.2. Résultats	133
II.2.1. Hypothèse n°1 : Modification du potentiel d'oxydo-réduction durant l'interaction entre <i>L. garvieae</i> et <i>S. aureus</i>	133
II.2.2. Hypothèse n°2 : Production de H ₂ O ₂ impliqué dans l'inhibition de <i>S. aureus</i> par <i>L. garvieae</i> en absence d'aération	134
II.2.3. Hypothèse n°3 : l'inhibition de <i>S. aureus</i> par <i>L. garvieae</i> serait médiée par la compétition pour la L-thréonine	134
II.2.4. Hypothèse n°4 : un autre effecteur de l'inhibition de <i>S. aureus</i> par <i>L. garvieae</i> serait extracellulaire	135

<i>Bilan du chapitre 3</i>	136
Article n°3 : New insights into the biopreservative potential of <i>Lactococcus garvieae</i> against <i>Staphylococcus aureus</i> using RNA sequencing profiling	137
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	155
Voie du peroxyde d'hydrogène : rôle et régulation durant la relation antagoniste.....	156
Production et contrôle par <i>L. garvieae</i> :.....	156
Réponse de <i>S. aureus</i> :.....	158
Autres mécanismes moléculaires identifiés potentiellement impliqués dans la relation antagoniste	159
Répression des gènes de réponse au stress de <i>S. aureus</i> par la présence de <i>L. garvieae</i> et par l'aération :	159
Répression des gènes de division cellulaire de <i>S. aureus</i> par la présence de <i>L. garvieae</i> : ..	159
Production d'un autre effecteur extracellulaire par <i>L. garvieae</i> :	160
Hypothèses de mécanismes impliqués dans la relation antagoniste invalidées au cours de cette étude :.....	160
Modulation de la virulence de <i>S. aureus</i> par <i>L. garvieae</i> :.....	161
Perspectives générales.....	161
Une démarche adaptable à d'autres contextes	161
Des données pouvant servir de pistes de compréhension d'autres relations antagonistes.....	162
<i>L. garvieae</i> , une bactérie bioprotectrice potentielle à mieux comprendre	163
REFERENCES	167
ANNEXES	189

- PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS -

PUBLICATIONS DANS JOURNAUX A COMITE DE LECTURE

- Article n°1 (pages 111 à 118) :
Delpech P, Bornes S, Alaterre E, Bonnet M, Gagne G, Montel M-C, Delbès C. 2015. *Staphylococcus aureus* transcriptomic response to inhibition by H₂O₂-producing *Lactococcus garvieae*. **Food Microbiology**.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002015001082>
- Article n°2 (pages 126 à 128) :
Bornes S, **Delpech P**, Rifa E, Almeida M, Hébert A, Abraham A-L, Loux V, Irlinger F, Montel M-C, Renault P, Delbès C. Genome Announcement : Genome sequence of *Lactococcus garvieae* N201 isolated from Saint-Nectaire cheese and showing anti-staphylococcal activities. (**bientôt soumis**)
- Article n°3 (pages 137 à 154) :
Delpech P, Rifa E, Nidelet S, Dubois E, Gagne G, Montel M-C, Delbès C, Bornes S. 2015. New insights into the biopreservative potential of *Lactococcus garvieae* against *Staphylococcus aureus* using RNA sequencing profiling. (**soumis, Applied and Environmental Microbiology**)

COMMUNICATIONS ORALES

- Congrès nationaux :
 - « Mécanismes d'inhibition de *Staphylococcus aureus* via la production de peroxyde d'hydrogène par *Lactococcus garvieae* » | **Delpech P**, Bornes S, Alaterre E, Labitrie C, Rifa E, Bonnet M, Moussard C, Gagne G, Montel M-C, Delbès-Paus C | **Colloque du Club des Bactéries Lactiques, Bordeaux** | 16 au 18 octobre 2013
 - « Caractérisation des mécanismes d'inhibition de *Staphylococcus aureus* par *Lactococcus garvieae* » | **Delpech P**, Bornes S, Bonnet M, Moussard C, Gagne G, Montel M-C, Delbès-Paus C | **Journée des Microbiologistes Clermontois, Clermont-Ferrand** | 15 avril 2014
- Communication orale à des acteurs du monde social, économique et culturel :
 - « Les bactéries *Staphylococcus aureus* et *Lactococcus garvieae* : un modèle intéressant dans l'étude de la lutte anti-microbienne » | **Delpech P** | **Echange doctorants-lycéens organisé par le Rectorat, Lycée Simone Weil, Le-Puy-en-Velay** | 24 janvier 2014
 - Trois **comités de pilotage de thèse avec des partenaires industriels** (Probionov, Biovitis, Institut de Recherche Pharmabiotique) : 9 novembre 2012, 4 juin 2013, 17 mars 2014.
- Comités de thèse :
11 décembre 2012 et 19 juin 2014 dans les locaux de l'INRA, URF, Aurillac

COMMUNICATIONS SOUS FORME DE POSTERS

- Congrès internationaux :

- « Characterization of inhibition mechanisms of *Staphylococcus aureus* by *Lactococcus garvieae* » | **Delpech P**, Bornes S, Bonnet M, Gagne G, Montel M-C, Delbès-Paus C | **Food Microbiology Congress, Nantes** | 1 au 4 septembre 2014

- « Analysis of *Lactococcus garvieae* transcriptome during inhibition of *Staphylococcus aureus* by RNA sequencing » | **Delpech P**, Rifa A, Nidelet S, Dubois E, Gagne G, Montel M-C, Delbès-Paus C, Bornes S | **JOBIM, Clermont-Ferrand** | 6 au 9 juillet 2015

- Congrès nationaux :

- « Caractérisation des interactions cellulaires et des métabolismes impliqués dans la lutte antimicrobienne » | **Delpech P**, Bornes S, Montel M-C, Bonnet M, Moussard C, Veissière P, Gagne G, Delbès-Paus C | **Congrès de la Recherche en IUT, Corte** | 12 au 14 juin 2013

- « Caractérisation des mécanismes d'inhibition de *Staphylococcus aureus* par *Lactococcus garvieae* » | **Delpech P**, Bornes S, Bonnet M, Gagne G, Montel M-C, Delbès-Paus C | **Journée de l'Ecole Doctorale SVSAE, Clermont-Ferrand** | 12 et 13 juin 2014

AUTRES

- Article de vulgarisation scientifique dans un magazine numérique :

- « Caractérisation des mécanismes menant à l'inhibition de *Staphylococcus aureus* par *Lactococcus garvieae* via la production de peroxyde d'hydrogène » | **Delpech P** | **Auvergne Sciences** | 8 septembre 2014

url = <http://www.auvergnesciences.com/blog/2014/09/08/caracterisation-mecanismes-menant-linhibition-staphylococcus-aureus-lactococcus-garvieae-via-production-peroxyde-dhydrogene/>

- « Le peroxyde d'hydrogène au centre du potentiel protecteur de *Lactococcus garvieae* vis-à-vis de bactéries pathogènes telles que *Staphylococcus aureus* (« staphylocoque doré ») » | **Delpech P** | **Auvergne Sciences** | 5 octobre 2015

url = <http://www.auvergnesciences.com/blog/2015/10/05/peroxyde-dhydrogene-au-centre-du-potentiel-protecteur-lactococcus-garvieae-vis-vis-bacteries-pathogenes-telles-staphylococcus-aureus-staphylocoque-dore/>

- LISTE DES TABLEAUX -

-Etude bibliographique -

Tableau 1. Bactériocines caractérisées (purifiées et/ou isolées) et produites par les différents genres de bactéries lactiques dont le rôle dans l'inhibition de *S. aureus* a été prouvé.

Tableau 2. Mortalité de sérioles chicards et de souris infectées par diverses souches de *L. garvieae* (Kawanishi et al., 2007, 2006; Reimundo et al., 2011).

Tableau 3. Epidémiologie des TIAC déclarées aux directions départementales des affaires sanitaires et sociales ou des services vétérinaires selon l'agent causal en France en 1999 et 2000 (issu de Haeghebaert et al., 2002).

Tableau 4. Exemples d'intoxications alimentaires référencées dues à *S. aureus* et survenus entre les années 1968 et 2009 dans le monde (adapté de Hennekinne et al., 2012).

Tableau 5. Liste de SEs and SEI identifiées chez diverses souches de *S. aureus* (adapté de Argudín et al., 2010).

Tableau 6. Conditions requises pour la croissance de *S. aureus* et la production d'entérotoxines (adapté de Hennekinne et al., 2012; Tatini, 1973).

Tableau 7. Effet de l'interaction bactérienne, de l'aération et de la concentration en H_2O_2 sur l'expression de gènes et protéines de *S. aureus* ou *L. lactis* impliqués dans la consommation du O_2 et production de H_2O_2 .

Tableau 8. Effet de l'interaction bactérienne, l'aération et la concentration en H_2O_2 sur l'expression de gènes et protéines de *S. aureus* ou *L. lactis* impliqués dans la résistance aux peroxydes dont le H_2O_2 .

Tableau 9. Principaux facteurs de stress induisant ou réprimant l'expression de gènes de réponse au stress de *S. aureus*, données issues du projet SAMMD (Nagarajan and Elasri, 2007).

Tableau 10. Effet de l'interaction bactérienne, de l'aération, de la concentration en H_2O_2 et de la température sur l'expression de gènes et protéines de *S. aureus*, *L. lactis* et *L. garvieae* codant pour les principales chaperonnes de réponse au stress.

Tableau 11. Protéines de *B. subtilis* identifiées comme ciblées par les divers complexes protéolytiques bactériens de type Clp, adapté de Frees et al. (2007).

Tableau 12. Effet de l'interaction bactérienne, de l'aération, de la présence de H_2O_2 et de la température sur l'expression des protéases et ATPases Clp de *L. lactis*, *L. garvieae* et de *S. aureus*.

Tableau 13. Effet de l'interaction bactérienne, de l'aération, de la présence de H_2O_2 et de la température sur l'expression des gènes et protéines de *S. aureus*, *L. lactis* et *L. garvieae* impliqués dans la régulation de la réponse au stress.

Tableau 14. Gènes dont la présence (« génome ») et l'expression (« transcriptome ») doivent être évaluée chez *L. garvieae* et *S. aureus*.

-Méthodologie -

Tableau 15. Paramètres et conditions de culture utilisés lors de ces travaux de thèse.

-Résultats -

Tableau 16. Gènes identifiés dans les souches de *S. aureus* SA15 ou MW2 potentiellement impliqués dans la virulence et / ou la réponse de *S. aureus* à *L. garvieae* N201.

Tableau 17. Vitesse d'élimination du peroxyde d'hydrogène après injection de H₂O₂ dans des cultures aérées de *S. aureus* SA15 et MW2 à DO₆₀₀=0,1.

Tableau 18. Gènes potentiellement impliqués dans l'inhibition de *S. aureus* identifiés dans la souche *L. garvieae* N201. Les gènes ont été identifiés par BLASTn.

Tableau 19. Gènes de virulence potentiellement identifiés dans le génome de plusieurs bactéries selon la E-value (recherche d'identité par BLASTn sur la base de données VFDB).

Tableau 20. Effet de l'aération sur l'expression de gènes déterminée par RNA-seq ou par RT-qPCR à 9 h (ratio de l'expression du gène en aération divisée par celle en absence d'aération).

- LISTE DES FIGURES -

-Etude bibliographique -

Figure 1. Génome cœur de *L. garvieae* établi par Ferrario et al. (2013) sur 11 souches d'origines différentes.

Figure 2. Organisation simplifiée de la chaîne respiratoire bactérienne.

Figure 3. Mode d'action simplifié des peroxirédoxines (AhpR), thiorédoxines (Trx), glutarédoxines (Grx) vis-à-vis du H₂O₂.

Figure 4. Modèle descriptif de réparation des lésions de l'ADN double-brin lors de la réponse SOS (tiré de McGrew and Knight, 2003).

Figure 5. Organisation du cluster *dcw* chez *E. coli* (d'après les travaux de Ayala et al., 1994; Boyle et al., 1997; Hara et al., 1997; Mingorance et al., 2004; Vicente et al., 1998).

Figure 6. Régulation des gènes de virulence (virulon) de *S. aureus* (adapté de Yarwood and Schlievert, 2003)

Figure 7. Stratégie utilisée lors de ce travail de thèse.

-Résultats -

Figure 8. Croissance en culture pure (traits pleins) ou co-culture (pointillés) sous différents niveau d'aération durant une cinétique de 24 h de : *L. garvieae* N201 sous aération élevée (A) ou sous aération faible (B), en culture pure (bleu), en co-culture avec *S. aureus* SA15 (vert) ou MW2 (rouge), *S. aureus* SA15 sous aération élevée (C) ou faible (D) et *S. aureus* MW2 sous aération élevée (E) ou faible (F).

Figure 9. Concentration en peroxyde d'hydrogène (en mM) mesurée dans les cultures sous aération de *L. garvieae* N201 inoculé seul (en bleu) ou en co-culture avec *S. aureus* SA15 (en vert) ou MW2 (en rouge) à 6 h, 9 h et 24 h.

Figure 10. Schéma simplifié des trois mécanismes moléculaires proposés menant à l'inhibition de *S. aureus* par *L. garvieae*.

Figure 11. Organisation du locus relatif à la bactériocine GarQ identifié suite à l'analyse par BAGEL3.

Figure 12. Evolution du potentiel d'oxydo-réduction au cours du temps dans du BHI non-inoculé ou inoculé par *L. garvieae* N201 et / ou *S. aureus* SA15 en condition d'aération faible.

Figure 13. Mécanismes moléculaires impliqués dans l'antagonisme de *L. garvieae* contre la croissance de *S. aureus*.

-Discussion et perspectives -

Figure 14. Mécanismes impliqués dans l'antagonisme de *L. garvieae* et réponse de *S. aureus* dans le cadre de l'interaction *L. garvieae* / *S. aureus*: (A) sous un niveau d'aération élevé ; (B) sous un niveau d'aération faible.

- LISTE DES ABREVIATIONS -

Abréviations répétées plusieurs fois dans le texte

Molécules :

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

HClO : acide hypochloreux

NaCl : chlorure de sodium ou plus couramment « sel »

ROS : Reactive-Oxygen Species (dérivés réactifs de l'oxygène O₂, tels que : H₂O₂ ; HO⁻ = ion hydroxyde ; O₂⁻ = ion « SuperOxyde »)

Gènes, protéines et voies métaboliques :

cluster *dcw* : cluster « division cell-wall » de division cellulaire

ETC : Electron-Transport Chain (chaîne respiratoire)

LOX : Lactate monooxygénase

NOX : NADH Oxydase

POX : Pyruvate Oxydase

SaPI : Staphylococcus aureus Pathogenicity Island

SE : Staphylococcal Enterotoxins

SEI : Staphylococcal Enterotoxins-like

SOD : SuperOxyde Dismutase

système *agr* : gènes directement régulés par *agrA*, c'est à dire *agrABCD* / RNA II et *hdl* / RNAIII

TCS : Two-Component System

TSST-1 : Toxic Shock Syndrom Toxin-1 (toxine de syndrome de choc toxique 1)

Bases de données et logiciels en ligne :

Aureolib : proteome signature library for *Staphylococcus aureus*

(<http://www.aureolib.de/>)

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn : recherche d'homologies avec des gènes à partir de séquences nucléotidiques ; BLASTx : recherche d'homologies avec des protéines à partir de séquences nucléotidiques)

(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome)

NCBI : National Center for Biotechnology Information

(www.ncbi.nlm.nih.gov/)

RAST : Rapid Annotation using Subsystem Technology

(<http://www.nmpdr.org/FIG/wiki/view.cgi/FIG/RapidAnnotationServer>)

RefSeq : base de données Reference Sequences

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>)

SAMMD : *Staphylococcus aureus* Microarray Meta-Database

(<http://www.bioinformatics.org/sammd/>)

VFDB : Virulence Factors DataBase

(<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>)

Techniques, méthodes :

PCR : Polymerase Chain-Reaction (Réaction en chaîne par polymérase)

RNA-seq : RNA sequencing (séquençage de l'ARN)

RT-qPCR : Reverse-Transcription quantitative PCR (transcription inverse puis PCR quantitative)

Milieux de culture :

BHI : Brain-Heart Infusion

BP : Baird-Parker

Divers :

DO (OD) : Densité Optique (en anglais : « Optical Density »)

G-C% : pourcentage de nucléotides G et C dans une séquence génétique

GRAS : Generally Recognized As Safe (label signifiant « généralement reconnu comme sûr »)

TIAC : Toxi-Infections Alimentaires Collectives

pH : potentiel Hydrogène

potentiel « redox » : potentiel d'oxydo-réduction (en anglais : « oxidation-reduction / redox potential »)

UFC (CFU) : Unité Formant Colonie (en anglais « Colony Forming Unit »)

AVANT-PROPOS

Le contrôle de la croissance de microorganismes indésirables durant la fabrication et la conservation d'aliments représente un enjeu économique et sanitaire important. Si certains antibiotiques sont couramment utilisés en ce but, comme la natamycine (conservateur n°E235 selon les normes de l'Union Européenne), leur emploi est de plus en plus sujet à controverses (Chang et al., 2015). D'autres stratégies se développent, dont la biopréservation visant à utiliser les capacités de micro-organismes ou de leurs métabolites naturels pour limiter le développement de microorganismes indésirables (pathogènes et/ou responsables d'altérations) et ainsi améliorer la qualité et la durée de vie d'un l'aliment (Zagorec et Christieans, coordinatrices, 2013). Si de nombreuses études dans le cadre des probiotiques ont caractérisé des mécanismes d'interaction entre une bactérie et un pathogène avec un effet final sur l'Homme, les mécanismes régissant ces interactions dans un contexte alimentaire sont encore peu connus. La compréhension de ces antagonismes représente donc un enjeu important pour la maîtrise et la promotion de la biopréservation.

Ce travail de thèse visait à donner des clefs de compréhension des antagonismes microbiens entre souches alimentaires à travers l'étude d'un modèle : l'inhibition de croissance du pathogène alimentaire *Staphylococcus aureus* par une bactérie lactique d'origine fromagère, *Lactococcus garvieae* (souche N201). En lait et *in vitro*, l'implication du peroxyde d'hydrogène produit par *L. garvieae* sous aération dans cet antagonisme a été proposé, mais d'autres acteurs encore non-identifiés seraient impliqués (Delbes-Paus et al., 2010). Dans ce contexte, le but de ce travail de thèse était de :

- décrire la voie du peroxyde d'hydrogène chez les deux acteurs de l'interaction à un niveau moléculaire et physiologique
- identifier un ou plusieurs autre (s) effecteur (s) impliqué(s) dans l'inhibition
- caractériser les mécanismes de défense de *S. aureus* vis-à-vis de cette inhibition

Ce manuscrit de thèse se compose de quatre sections principales.

Premièrement, une **étude bibliographique** référence les données actuelles sur :

- les facteurs mis en jeu dans les activités antagonistes de bactéries lactiques vis-à-vis de *S. aureus*
- l'inhibition de croissance de *S. aureus* par *L. garvieae*
- les connaissances moléculaires sur les mécanismes expliquant potentiellement l'antagonisme de *L. garvieae* vis-à-vis de *S. aureus*

Deuxièmement, une section de **méthodologie** décrit le matériel et les méthodes utilisés durant ce travail et explicite l'intérêt des techniques et conditions choisies.

Troisièmement, une section de **résultats** développe les données obtenues lors de ce travail de thèse en trois chapitres concernant :

- l'effet de l'aération sur l'évolution de la croissance de *L. garvieae* et *S. aureus* en interaction et sur la concentration en peroxyde d'hydrogène
- la réponse de *S. aureus* à l'inhibition de croissance
- les mécanismes de *L. garvieae* impliqués dans cet antagonisme

Enfin, une section de **discussion et perspectives** clot ce manuscrit.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Activités antagonistes des bactéries lactiques vis-à-vis de

***Staphylococcus aureus* : principaux facteurs biotiques et**

abiotiques mis en jeu

Plusieurs antagonismes microbiens ont été découverts dans un contexte de santé humaine ou de sécurité sanitaire des aliments. L'inhibition de pathogènes par les bactéries lactiques dans leur matrice organique naturelle, c'est à dire les produits laitiers et autres aliments fermentés ou dans l'écosystème vaginal, a été particulièrement explorée (Aldunate et al., 2015; Charlier et al., 2009; Kao and Frazier, 1966; Stiles, 1996). Ces études ont fréquemment eu pour objet l'inhibition de *Staphylococcus aureus*, un pathogène humain majeur se développant facilement dans ces écosystèmes. Divers mécanismes d'inhibition ont été identifiés (pour revue : Charlier et al., 2009). Ceux-ci sont présentés dans les paragraphes suivants.

I.1. Ratio entre la souche antagoniste et le pathogène

Le ratio de concentration initiale entre la bactérie lactique inhibitrice et la bactérie pathogène ciblée influe sur l'amplitude de l'inhibition. En effet, il a été remarqué que plus le ratio *Lactococcus lactis* / *S. aureus* ou *Lactococcus garvieae* / *S. aureus* était élevé, plus l'inhibition de *S. aureus* semblait forte (Alomar et al., 2008a; Haines and Harmon, 1973a). Un résultat comparable a été obtenu en modifiant les concentrations des ferments (bactéries lactiques) ou de *S. aureus* dans divers contextes de fabrication fromagère (Delbes et al., 2006; Gómez-Lucía et al., 1992; Koenig and Marth, 1982; Meyrand et al., 1998). De la même façon, un ratio ferment lactique / *S. aureus* élevé accentue l'inhibition de *S. aureus* durant la fabrication d'un salami italien (Metaxopoulos et al., 1981).

La concentration de *S. aureus* dans le lait après la traite est généralement de l'ordre de 10^2 UFC.mL⁻¹ mais une vache atteinte de mammite peut excréter du lait contaminé jusqu'à 10^8 UFC.mL⁻¹, en moyenne plutôt 10^4 UFC.mL⁻¹ (Medvedová and Valík, 2012). Les bactéries lactiques faisant partie des populations microbiennes dominantes dans les produits laitiers, le ratio bactérie lactique / *S. aureus* est généralement très élevé (Charlier et al., 2009; Haines and Harmon, 1973a). Ceci suggère un potentiel biopréservateur naturel important des bactéries lactiques dans les produits laitiers.

I.2. Production d'acides organiques et acidification du milieu

Les bactéries lactiques sont à l'origine de processus de fermentation nécessaires pour la fabrication des produits laitiers et de nombreux aliments fermentés. Ces bactéries produisent des acides organiques abaissant le pH du milieu de manière plus ou moins forte selon les espèces et les souches. La croissance de *S. aureus*, tout comme sa production d'entérotoxines, est possible entre des valeurs de pH approximativement comprises entre 4 et 10 et optimale pour un pH proche de la neutralité (Hennekinne et al., 2012; Tatini et al., 1973). Mais l'effet de l'acidité sur un microorganisme dépend avant tout de la nature de l'acide organique. En contexte de fermentation alimentaire, les acides organiques produits par les bactéries lactiques sont essentiellement l'acide lactique et acétique. Comparé à d'autres acides organiques, ces acides ont un effet fort sur la croissance de *S. aureus* et peuvent induire son inhibition totale à partir de valeurs de $\text{pH} \leq 4,5-5$ (Charlier et al., 2009; Minor and Marth, 1970; Tatini et al., 1971). Ainsi, l'acidification du milieu par des bactéries lactiques est corrélée à l'inhibition de *S. aureus* durant la fabrication de divers produits fermentés (Barber and Deibel, 1972; Delbes et al., 2006; Georgieva et al., 2015; Metaxopoulos et al., 1981). Plus ces souches seraient acidifiantes, meilleur serait leur potentiel en tant que ferment pour inhiber la croissance de pathogènes. Cependant, l'acidification légère du milieu par *L. lactis* n'est pas impliquée dans l'inhibition du développement de *S. aureus* durant les premières 24 h de croissance (Charlier et al., 2008). Comparé à d'autres bactéries lactiques, *L. garvieae* acidifie peu le milieu et inhibe tout autant la croissance de *S. aureus* (Alomar et al., 2008b). D'autres facteurs peuvent donc expliquer l'inhibition de *S. aureus* par les bactéries lactiques.

I.3. Compétition nutritionnelle

Le développement de pathogènes peut être contrôlé par la limitation de composants nutritionnels essentiels à leur croissance. *S. aureus* utilise divers composés organiques pour sa croissance selon les conditions, le milieu et les disponibilités, tels que des sucres (fructose, glucose, tréhalose, galactose, mannose, ribose, maltose, saccharose), du mannitol, de l'acétate et des acides aminés (Charlier et al., 2009). La construction de modèles *in silico* basés sur les connaissances génomiques de cette espèce ont permis de clarifier les besoin nutritionnels de *S. aureus*. Deux

modèles ont permis de conclure que la croissance de *S. aureus* nécessitait une source de carbone complexe telle que du glucose mais aussi des ions / cofacteurs tels que le fer, la nicotinamide ou le nicotinate et la thiamine (Becker and Pálsson, 2005; Heinemann et al., 2005). Aucune auxotrophie particulière pour un acide aminé n'a été notée mais Becker et Pálsson (2005) ont proposé que la présence d'au moins un acide aminé parmi la proline, l'arginine, le glutamate, l'alanine, l'aspartate, la glycine, l'ornithine, la serine ou la thréonine serait nécessaire en tant que source nutritive. Ces études ont permis d'avoir une vision globale du métabolisme de *S. aureus*, mais les besoins nutritionnels d'une bactérie peuvent varier selon le milieu et les conditions (notamment l'aération ou la présence d'autres bactéries). Plusieurs études *in vitro* ont ainsi identifié des acides aminés essentiels à la croissance de *S. aureus* différents selon les conditions et l'origine des souches (Charlier et al., 2009; Emmett and Kloos, 1975; Kuroda et al., 2001; Lincoln et al., 1995; Miller and Fung, 1973; Onoue and Mori, 1997; Pohl et al., 2009). Parmi les 20 acides aminés protéinogènes universels, tous sauf 2 (asparagine et glutamine) ont déjà été identifiés comme essentiels dans au moins un contexte et pour au moins une souche de *S. aureus*. Ainsi, selon les conditions, la consommation d'acides aminés ou d'autres composants du milieu par les bactéries lactiques peut entraîner l'inhibition de croissance de *S. aureus*. Par exemple, une compétition nutritionnelle pour le nicotinamine a été mise en évidence entre une communauté de bactéries lactiques, dont *L. lactis*, et *S. aureus*, au détriment de la croissance de ce dernier (Iandolo et al., 1965). Par la suite, le rôle central de *L. lactis* dans cette inhibition *via* la compétition nutritionnelle a été confirmé (Charlier et al., 2008; Haines and Harmon, 1973b). L'expression de plusieurs gènes de *S. aureus* et *L. lactis* liés à des mécanismes nutritionnels sont modifiés par l'interaction avec l'autre bactérie (Cretenet et al., 2011; Nouaille et al., 2009), appuyant cette hypothèse.

I.4. Bactériocines

Les bactériocines sont des peptides à activité antimicrobienne ciblée produits par les bactéries. Elles présentent l'avantage de pouvoir être purifiées et utilisées sans la bactérie productrice. Ainsi, elles font l'objet d'un intérêt soutenu depuis plusieurs années, particulièrement celles produites par les bactéries lactiques dans le cadre de mécanismes d'antagonisme contre des pathogènes alimentaires tels que *S. aureus* (Gálvez et al., 2007). Deux bactériocines produites par

les bactéries lactiques sont aujourd’hui commercialisées en tant qu’agents biopréservateurs, la nisine (en tant qu’additif alimentaire et conservateur n°E234 selon les normes de l’Union Européenne) et la pediocine PA-1 (Deegan et al., 2006; Delves-Broughton et al., 1996).

Tableau 1. Bactériocines caractérisées (purifiées et/ou isolées) et produites par les différents genres de bactéries lactiques dont le rôle dans l’inhibition de *S. aureus* a été prouvé.

Genre	Nombre	Noms	Références
<i>Lactococcus</i> sp.	8	Bactériocine KU24, Lacticine 3147 et 481, Lactococcine A, B et M, Nisine A et Nisine F	(Kwaadsteniet et al., 2008; Lee et al., 2013)
<i>Lactobacillus</i> sp.	17	Acidocine A, B et LCHV, Bactériocine L-1077 et PJ4, Bactofencine A, Curvaticine 13, Lactocine 27, Paracaséine A, Plantaricine 149a, C, KL-1Y, IIA-1A5, ZJ008 et ZJ5, Sakacine A et B	(Arief et al., 2015; Bendjeddou et al., 2012; Bogovic-Matijasić et al., 1998; de Souza Lopes et al., 2013; Jena et al., 2013; Mkrtchyan et al., 2010; O’Shea et al., 2013; Rumjuankiat et al., 2015; Song et al., 2014; Svetoch et al., 2011; Zhu et al., 2014)
<i>Pediococcus</i> sp.	2	Pediocine A et PA-1	
<i>Leuconostoc</i> sp.	1	Leucocine A-UAL187	
<i>Enterococcus</i> sp.	7	Bactériocine ST15 et GM-1, Entéroccine A, AS-48, B, P et RM6	(Huang et al., 2013; Kang and Lee, 2005; Liu et al., 2011; Viedma et al., 2009)
<i>Carnobacterium</i> sp.	4	Carnocine H, Carnocycline A, Divercine V41, Piscicoline 126	(Martin-Visscher et al., 2008)
<i>Streptococcus</i> sp.	3	Macédocine ST91KM, Mutacine KSM43, Suicine 90-1330	(Ahmad and Rasool, 2003; LeBel et al., 2014; Pieterse et al., 2008)

Données issues de la revue de Charlier et al. (2009) et complétées par les travaux récents (indiqués en référence).

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont généralement des bactériocines de classe I ou II, c’est-à-dire de petits peptides (<10 kDa), thermiquement stables, voire très stables pour la classe IId (Maldonado-Barragán et al., 2013; Song et al., 2014), et possédant (classe I) ou non (classe II) des acides aminés lanthionine ou méthyllanthionine (Deegan et al., 2006). Elles sont produites par des clusters de gènes comprenant généralement des gènes de synthèse, d’export et d’immunité vis-à-vis de la bactériocine. La plupart des bactériocines ciblent la

membrane, formant alors des pores entraînant la lyse de leur cible. Certaines peuvent également affecter le métabolisme de leur cible (Reisinger et al., 1980).

A l'heure actuelle, 41 bactériocines produites par des bactéries lactiques et inhibant la croissance de *S. aureus* ont été caractérisées (Tableau 1).

I.5. ROS et peroxyde d'hydrogène

En présence d'oxygène, divers métabolismes cellulaires peuvent aboutir à la formation de ROS (pour « Reactive Oxygen Species » ou dérivé réactif de l'oxygène), généralement toxiques. Les cellules productrices de ROS disposent le plus souvent d'enzymes capables de les dégrader. Parmi ces ROS, les peroxydes (de formule R-O-O-R') et principalement le peroxyde d'hydrogène (H-O-O-H, soit H₂O₂), ont été identifiés dans plusieurs mécanismes d'inhibition. Le peroxyde d'hydrogène provoque un effet bactéricide sur la croissance de *S. aureus* (Amin and Olson, 1968) mais un effet bactériostatique a également été observé à des concentrations faibles, entre 0,15 mM et 0,88 mM (Baldry, 1983). La plupart des bactéries lactiques sont capables de produire du peroxyde d'hydrogène dans des conditions variables (Klebanoff et al., 1991) à des concentrations généralement comprises entre 0,5 mM et 10 mM (Ito et al., 2003), suggérant un effet bactéricide. Dans l'écosystème vaginal, l'effet antagoniste de bactéries lactiques vis-à-vis de *S. aureus* via la production de H₂O₂ a été largement suggéré (Ocaña et al., 1999a, 1999b; Otero and Nader-Macías, 2006). Pourtant, un tel effet est peu documenté dans le cas de souches de bactéries lactiques d'origine alimentaire (Charlier et al., 2009). Dans les années 1960, il a été observé que la production de H₂O₂ par des souches de *L. lactis* et *Lactococcus bulgaricus* isolées de yaourts jouait un rôle dans l'inhibition de *S. aureus* (Dahiya and Speck, 1968). Cependant, cet effet observé à 5°C n'a pas été observé dans d'autres conditions (Gilliland and Speck, 1974). A notre connaissance, la seule bactérie lactique d'origine alimentaire (fromage) étudiée pour ses capacités antagonistes de la croissance de *S. aureus* via la production de H₂O₂ est *L. garvieae* (Alomar et al., 2008a, 2008b; Delbes-Paus et al., 2010).

II. Inhibition de *S. aureus* par *L. garvieae* : un modèle de relation antagoniste entre une bactérie lactique et un pathogène

Depuis quelques années, l'effet antagoniste de *L. garvieae* contre le développement de *S. aureus* a fait l'objet d'un intérêt particulier de par le mode d'inhibition original proposé, impliquant le peroxyde d'hydrogène (Delbes-Paus et al., 2010), et du potentiel technologique de *L. garvieae* dans les produits laitiers (Fernández et al., 2010; Ferrario et al., 2013). Pour évaluer le potentiel de *L. garvieae* comme agent biopréservateur, il est nécessaire de caractériser les mécanismes d'interaction entre *L. garvieae* et *S. aureus*. Dans ce chapitre sont présentés premièrement le potentiel et les limites de l'utilisation de *L. garvieae* en tant qu'agent biopréservateur, deuxièmement les mécanismes de virulence de *S. aureus* et comment contrôler la croissance et la virulence de cette bactérie et finalement l'état des connaissances sur les facteurs impliqués dans l'antagonisme de *L. garvieae* vis-à-vis de *S. aureus*.

II.1. *Lactococcus garvieae*, un agent au potentiel biopréservateur

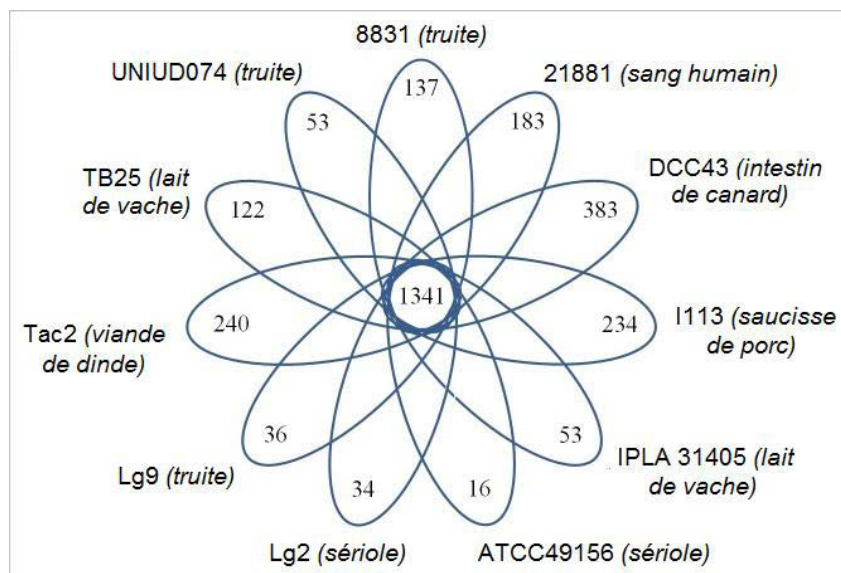
Les bactéries lactiques sont des organismes à Gram⁺, assimilant les sucres par fermentation en anaérobiose pour former de l'acide lactique, et généralement tolérantes à l'oxygène (Pfeiler and Klaenhammer, 2007; Stackebrandt and Teuber, 1988; Thompson, 1988). Elles appartiennent à l'ordre des *Lactobacillales* et plus précisément aux genres *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* et *Tetragenococcus*. Elles peuvent coloniser de nombreuses niches écologiques telles que les produits laitiers, les viandes, les végétaux et diverses muqueuses animales (Pfeiler and Klaenhammer, 2007). Le genre *Lactococcus* regroupe des bactéries de type coque, mésophiles, à la croissance formant de courtes chaînettes et sans activité catalasique. Dans ce chapitre sont présentés les limites et les intérêts à étudier l'antagonisme de *L. garvieae* vis-à-vis de pathogènes, particulièrement *S. aureus*, afin d'explorer la potentialité de cette espèce en tant qu'agent biopréservateur.

II.1.1. Caractéristiques principales de *L. garvieae*

Lactococcus garvieae est une bactérie du genre *Lactococcus*, initialement et par erreur identifiée dans le genre *Streptococcus* et nommée *Streptococcus garvieae* (Collins et al., 1983), puis dans le genre *Enterococcus* et nommée *Enterococcus seriolicida* (Doménech et al., 1993; Kusuda et al., 1991; Teixeira et al., 1996). Initialement isolée d'une mammite de vache laitière (Collins et al., 1983), elle a aujourd'hui été isolée aussi bien de divers écosystèmes laitiers (cf. II.1.3.1.) que de nombreux animaux aquatiques (cf. II.1.2.1.1.), de volailles (Borrero et al., 2011; Ricci et al., 2013), de chats, de chiens (Pot et al., 1996), de crotale sauvage (McLaughlin et al., 2014) et de végétaux tels que des salades, des radis et des brocolis (Ferrario et al., 2013; Kawanishi et al., 2007). Elle a également été isolée chez l'Homme (cf. II.1.2.1.3).

Actuellement, 17 souches de *L. garvieae* d'origines variées ont été séquencées et référencées sur la base de données du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/699>), dont 2 génomes complets et 15 assemblages partiels (1 au stade des scaffolds et 14 au stade des contigs). Ces souches possèdent un génome dont la taille est comprise entre 1,9 et 2,3 Mb, avec un G-C% (pourcentage de G-C dans le génome) entre 37,7% et 38,9% et contenant entre 1937 et 2271 gènes codant pour 1857 et 2159 protéines. Le génome cœur le plus récent a été établi avec 11 souches (5 isolées de poissons, 1 de lait de vache, 1 de fromage de lait de vache, 1 de sang humain, 2 de volailles et 1 de saucisses de porc) et comporte 1341 gènes (Figure 1).

Figure 1. Génome cœur de *L. garvieae* établi par Ferrario et al. (2013) sur 11 souches d'origines différentes.



Les souches de *L. garvieae* contiennent chacune en moyenne 136 gènes spécifiques, avec un minimum inférieur à 40 gènes pour trois souches aquatiques et un maximum supérieur à 200 gènes pour les deux souches isolées de volailles et la souche isolée de saucisses de porc. Par ailleurs, ces souches de *L. garvieae* possèderaient 949 gènes en commun avec trois autres bactéries lactiques, *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* et *Lactococcus raffinolactis*, soulignant la proximité génétique de *L. garvieae* avec ces espèces (Ferrario et al., 2013).

Certaines souches possèdent des plasmides (Aguado-Urda et al., 2012; Flórez and Mayo, 2015; Gabrielsen et al., 2012; Guglielmetti et al., 2009; Maki et al., 2009; Ricci et al., 2013) qui peuvent jouer un rôle dans la résistance aux antibiotiques (Guglielmetti et al., 2009; Maki et al., 2009), l'adaptation à la matrice laitière (Flórez and Mayo, 2015), ou encore la synthèse de bactériocines et la virulence (Aguado-Urda et al., 2012).

Certaines souches synthétisent des bactériocines. A ce jour, quatre types de bactériocines de *L. garvieae* ont été découverts. Les garvieacines A (Maldonado-Barragán et al., 2013), ML (Borrero et al., 2011; Gabrielsen et al., 2014), Q (Flórez et al., 2012; Tosukhowong et al., 2012) et L1-5 (Villani et al., 2001) exercent chacune des activités antimicrobiennes spécifiques. La garvieacine A inhibe spécifiquement *L. garvieae* lui-même (non-active contre les autres bactéries lactiques ou d'autres bactéries) en empêchant la formation du septum. Les trois autres bactériocines ont des spectres d'action assez proches et peuvent inhiber à la fois des bactéries lactiques, dont *L. garvieae*, mais aussi des bactéries du genre *Clostridium* et *Listeria*. Elles sont en revanche inefficaces contre *Escherichia coli* et le genre *Salmonella*. L'efficacité de la garvieacine Q a été testée contre une souche de *S. aureus* avec un résultat négatif. Néanmoins, il a été observé que l'activité inhibitrice de la garvieacine Q variait selon la souche de l'organisme ciblé.

II.1.2. Limites à l'utilisation de *L. garvieae* en tant qu'agent biopréservateur

II.1.2.1. Entre souche pathogène, opportuniste et commensale

II.1.2.1.1. Lactococcose d'espèces aquatiques

Les streptococcoses, identifiées dans les années 1950 (Vendrell et al., 2006), et les lactococcoses, identifiées dans les années 1990 (Kusuda et al., 1991; Williams et al., 1990), sont des maladies graves et souvent mortelles pour les animaux aquatiques.

Tableau 2. Mortalité de sérioles chicards et de souris infectées par diverses souches de *L. garvieae* (Kawanishi et al., 2007, 2006; Reimundo et al., 2011).

Souche	Origine	Mortalité ^a		Pathogénicité vis-à-vis des mammifères
		Sériole chicard	Souris	
HF	Humain, France	-	-	Endocardite (sans décès)
Lg2	Sériole chicard, Japon	+++	-	NT
Lg2-S	Sériole chicard, Japon	+	-	NT
Lg8, 27, 74, 96, 122 et 147	Sériole chicard, Japon	+++	-	NT
ATCC49156	Sériole chicard, Japon	-	-	NT
ATCC49157	Sériole chicard, Japon	+	-	NT
KG9502	Sériole chicard, Japon	+++	-	NT
Lg6, 38 et 44	Sériole couronnée, Japon	+++	+	NT
01/5664	Truite, Espagne	++	-	NT
CP-1	Truite, Espagne	++	-	NT
1684	Truite, Italie	+	+	NT
UNIUD074	Truite, Italie	+++	+++	NT
LMG8501, 9443, 7472, 14413, 14419 et 14492	Vache, Belgique	-	-	Mammite
LMG14416	Vache, Belgique	-	+	Mammite
G-34	Vache, Espagne	-	-	Mammite
ATCC43921	Vache, Royaume-Uni	-	-	Mammite
1364/02b et 170/03a	Porc, Espagne	-	-	NT
LMG12175	Chien, Belgique	-	-	NT
LMG13620 et 13633	Chat, Belgique	-	-	NT
LMG14493	Cheval, Belgique	+	-	NT
NRIC0611 et 612	Brocoli, Japon	-	-	NT
NRIC0607 à 610	Radis blanc, Japon	-	-	NT

La souche HF est la seule souche issue de pathologie humaine dont la virulence a été testée sur d'autres modèles. ^a La mortalité relative est indiquée, « +++ » signifiant que tous les animaux sont décédés dans l'expérience, « - » signifiant qu'aucun animal n'est décédé et « + » / « ++ » signifiant que des animaux sont décédés mais que certains ont survécu. Ces indications sont relatives, étant donné que les doses d'injection de *L. garvieae* ne sont pas les mêmes dans les trois publications référées ici. NT = Non testé.

Les lactococcoses à *L. garvieae* causent divers symptômes plus ou moins graves pouvant aller jusqu'au décès des poissons (Eldar and Ghittino, 1999; Vendrell et al., 2006). Elles représentent ainsi une perte de productivité pour l'industrie piscicole pouvant aller jusqu'à 80%. Les lactococcoses se propagent en « eaux chaudes » (>15°C) et ont donc été identifiées à travers le monde entier (Eldar et al., 1999; Eynogor et al., 2004; Vendrell et al., 2006). Ainsi, *L. garvieae* peut infecter un grand nombre d'animaux aquatiques tels que diverses espèces de truites (Chang

et al., 2002; Eyngor et al., 2004; Miyauchi et al., 2012; Palacios et al., 1993; Reimundo et al., 2011), le mulot gris (Chen et al., 2002), la sériole (Kusuda et al., 1991), la carangue dentue (Madinabeitia et al., 2009), la girelle clown (Colorni et al., 2003), le tilapia (Anshary et al., 2014; Evans et al., 2006), le poisson-zèbre (Aguado-Urda et al., 2014) et la crevette géante d'eau douce (Chen et al., 2001). Des souches de *L. garvieae* ont également été isolées à partir d'une conjonctivite de tortue et de muscles et reins d'un dauphin décédé sans qu'un lien causal n'ait été établi (Evans et al., 2006; Pot et al., 1996). La bactérie lactique a été récemment isolée à partir du système digestif de pieuvres communes mais elle ferait plutôt partie du microbiote commensal intestinal (Iehata et al., 2015).

La virulence de *L. garvieae* contre ces espèces aquatiques est dépendante des souches. En effet, des études comparatives du pouvoir pathogène de *L. garvieae* ont permis de mettre en évidence que la pathogénicité de cette bactérie était spécifique à l'écosystème d'origine de la souche, sauf rares exceptions (Tableau 2). Ainsi, la majorité des souches ne provenant pas d'un écosystème aquatique ne présente aucune capacité pathogène contre les poissons, et inversement. Les mécanismes de virulence de *L. garvieae* seraient alors différents selon l'organisme infecté (Kawanishi et al., 2007, 2006; Reimundo et al., 2011).

II.1.2.1.2. Mammites d'espèces laitières

Les mammites sont des inflammations des glandes mammaires pouvant causer de sévères pertes de production pour l'industrie laitière. Elles sont généralement dues à l'entrée de divers microorganismes pathogènes dans la glande mammaire (De Vliegher et al., 2012). Bien qu'elles puissent entraîner des complications extérieures, elles restent généralement longtemps internes à la glande mammaire et donc invisibles.

La première souche isolée de *L. garvieae* provenait d'une mammite de vache laitière (Collins et al., 1983). Depuis, *L. garvieae* a été isolé d'autres mammites de vache laitières (Devriese et al., 1999; Reimundo et al., 2011; Tejedor et al., 2011; Vela et al., 2000; Wyder et al., 2011) et de bufflonnes domestiques (Carvalho et al., 1997; Teixeira et al., 1996; Vela et al., 2000), mais le pouvoir pathogène de *L. garvieae* en lien avec les mammites reste encore à éclaircir (Wyder et al., 2011). Si certaines souches de *L. garvieae* ont une activité hémolytique cohérente avec un pouvoir pathogène dans ce cadre, isoler *L. garvieae* de mammite n'est pas une preuve de leur implication étant donné que cette bactérie fait partie du microbiote naturel du lait des bovins et

ovins. Parmi les souches testées pour leur virulence, la majorité des souches isolées de vaches laitières n'engendre aucun symptôme infectieux dans des sérioles ou des souris, suggérant une absence de pouvoir pathogène (Tableau 2).

II.1.2.1.3. Un pathogène opportuniste de l'Homme ?

L. garvieae a pu être isolé à partir de pathologies chez l'être humain dans près de vingt cas entre 1998 et 2015 dont deux patients décédés (Backes et al., 2015; Fefer et al., 1998; HerasCañas et al., 2015; Ortiz et al., 2014; Tsur et al., 2014). Il a ainsi pu être identifié dans des cas d'ostéomyélite, bactériémie, abcès hépatique, péritonite mais surtout plusieurs cas d'endocardite. Il a été contracté essentiellement après ingestion de poisson contaminé cru par des sujets déjà immunodéprimés (personnes âgées et/ou déjà malades). Cette bactérie étant présente en concentration importante dans de nombreux produits alimentaires (produits laitiers, poissons, bovins, ovins), le paradoxe entre le faible nombre de cas et les grandes quantités consommées appuie l'hypothèse d'une absence de mécanismes de virulence efficaces contre l'homme dans un état normal de santé. De ce fait, il est généralement admis que les infections de *L. garvieae* chez les mammifères seraient plutôt dues à un développement opportuniste (Aguado-Urda et al., 2011; Mofredj et al., 2007; Ortiz et al., 2014). Appuyant cette hypothèse, la souche HF isolée d'une endocardite humaine n'a aucun pouvoir pathogène ni sur la truite ni sur la souris (Tableau 2, Reimundo et al., 2011).

II.1.2.1.4. Mécanismes de virulence

La virulence de *L. garvieae* est dépendante des souches et de l'hôte concerné, comme discuté précédemment (Tableau 2). Les mécanismes sous-jacents sont encore peu caractérisés.

Certaines souches pathogènes de poissons possèdent un cluster codant pour une capsule, dont un rôle dans la virulence a été suggéré il y a une dizaine d'années (Barnes and Ellis, 2004). Ce cluster consiste en 15 gènes dont 8 sont potentiellement impliqués dans la synthèse d'exopolysaccharides (Morita et al., 2011). La souche *L. garvieae* Lg2-S, dérivée de *L. garvieae* Lg2 mais ne possédant pas le cluster de la capsule est très peu virulente contre son hôte, la sériole, alors que la souche Lg2 est très virulente (Miyauchi et al., 2012; Morita et al., 2011). De plus, la souche aquatique ATCC49156 ne possède pas de capsule et est totalement avirulente (Miyauchi et al., 2012). La capsule jouerait donc un rôle crucial pour la virulence des souches

aquatiques de *L. garvieae* contre les poissons. Néanmoins, le fait que *L. garvieae* Lg2-S soit encore légèrement virulente suggère que d'autres mécanismes de virulence existent. Les hémolysines pourraient constituer un autre facteur important de virulence, notamment à cause de leur implication théorique dans des phénomènes de septicémies. Elles ont été détectées dans plusieurs souches aquatiques mais aussi dans une souche provenant de sang humain (Miyauchi et al., 2012). Néanmoins, aucun rôle direct dans la virulence n'a été démontré. Des gènes codant pour des adhésines ont également été identifiés dans plusieurs souches aquatiques, mais dans aucune souche humaine.

Le fait que la souche Lg2 code pour la capsule alors qu'elle n'est pas virulente contre les souris a permis de suggérer que cette capsule n'était pas impliquée dans la virulence contre les mammifères (Miyauchi et al., 2012; Morita et al., 2011). Les gènes codant pour la capsule ne sont pas présents dans les souches humaines ni dans certaines souches non-virulentes contre la sériole ou la souris (Kawanishi et al., 2007; Kim et al., 2013; Miyauchi et al., 2012). Les souches de *L. garvieae* d'origine fromagère ne semblent pas non plus porteuses des gènes codant pour la capsule (Fernández et al., 2010). De plus, aucune activité hémolytique n'a été mesurée lors de deux études sur un total de 106 isolats de *L. garvieae* provenant de trois fromages différents d'origine italienne (Fortina et al., 2007) et espagnole (Fernández et al., 2010). Ceci appuie l'hypothèse selon laquelle les souches de *L. garvieae* isolées de pathologies humaines ne possèdent pas de mécanisme de virulence spécifique mais sont plutôt des pathogènes opportunistes. Néanmoins, le rôle des hémolysines lors d'un éventuel passage dans le sang de *L. garvieae* reste à éclaircir.

II.1.2.2. Inhibition par d'autres bactéries

L'utilisation d'un agent biopréservateur peut s'avérer fortement limitée si d'autres bactéries de son écosystème d'action peuvent porter atteinte à sa croissance. Or, le microbiote intestinal de la truite, composé essentiellement des bactéries lactiques, peut inhiber la croissance et le développement de *L. garvieae* (Araújo et al., 2015; Pérez-Sánchez et al., 2011). Parmi les bactéries du microbiote intestinal du mulot gris, une souche d'*Enterococcus thailandicus* peut également inhiber la croissance de *L. garvieae* (Lin et al., 2013). Une souche aquatique de *L. lactis* peut également inhiber la croissance de *L. garvieae* grâce à la production de nisine (Sequeiros et al., 2015).

Cependant, les seules souches bactériennes inhibitrices de *L. garvieae* identifiées sont des souches aquatiques et ne peuvent probablement donc pas diminuer l'intérêt potentiel de *L. garvieae* en matrice alimentaire. De plus, il a été démontré que la croissance de *L. garvieae* était identique en lait pasteurisé, microfiltré ou cru, suggérant que le microbiote naturel du lait n'avait pas d'effet sur sa croissance (Delbes-Paus et al., 2010). L'activité inhibitrice contre les staphylocoques à coagulase positive de *L. garvieae* a été observée dans ces trois types de lait.

II.1.2.3. Effet toxique du H₂O₂ pour l'Homme

Le peroxyde d'hydrogène est un composé cytotoxique pour de nombreux types de cellules et tissus humains (Corvaglia et al., 1967; Granata and Pennarola, 1970; Riley and Giblin, 1982; Simon et al., 1981) à concentrations supérieures à 50 mM (Bates et al., 1985; Hanks et al., 1993; Li, 1996; Rubin and Farber, 1984). Néanmoins, le peroxyde d'hydrogène est rapidement dégradé par les cellules humaines (Ramp et al., 1987) et est assez instable dans le lait du fait de la présence de nombreux agents catalytiques (ions, catalase, lactoperoxydase, etc). Disposant du statut GRAS (Generally Recognized As Safe) aux Etats-Unis, son utilisation dans les produits laitiers est permise en tant qu'agent désinfectant (Ölmez and Kretzschmar, 2009). Le peroxyde d'hydrogène étant produit par les bactéries lactiques à des concentrations maximales généralement inférieures à 10 mM (Ito et al., 2003; Ocaña et al., 1999b; Viswanathan et al., 2014), sa toxicité pour l'Homme dans notre contexte d'étude est donc négligeable.

II.1.3. Intérêt biotechnologique de *L. garvieae*

II.1.3.1. Ubiquité dans les produits laitiers

L. garvieae est une bactérie ubiquiste présente dans le lait d'espèces animales différentes. En plus de sa présence dans les pis constatée lors de mammites, elle a également été isolée à partir de lait de vaches (Villani et al., 2001) et de chèvres (Callon et al., 2007) en bonne santé. Depuis, l'ubiquité de *L. garvieae* dans les produits fabriqués à base de lait issu de ces animaux a été confirmée malgré des origines et méthodes de fabrication variées. Des souches de *L. garvieae* ont en effet été identifiées dans du lait fermenté Zabady en Egypte (El-Baradei et al., 2008), de la crème de lait Kajmak en Serbie (Jokovic et al., 2008) ainsi que dans des fromages espagnols tels que le bleu de Cabrales (Flórez and Mayo, 2006) et le Casín (Alegría et al., 2009), italiens tels

que le Toma Piemonte, le Caprino Lombardo (Fortina et al., 2007), le Grana Trentino (Monfredini et al., 2012) et le Valtellina Casera (Morandi et al., 2015), polonais et slovaques tels que le Bundz, le Bryndza, le Golka fumé ou non-fumé et le Warkocze (Pangallo et al., 2014; Sip et al., 2009) et français dont le Saint-Nectaire (Alomar et al., 2008b).

En plus de ces divers produits laitiers et des animaux et végétaux évoqués précédemment et pouvant entrer dans la chaîne alimentaire (poissons, crevettes, poulpes, viande de bovins, d'ovins et de canards, salades, brocolis et radis), des souches de *L. garvieae* ont été isolées à partir d'autres aliments ou dérivés : des saucisses de porc fermentées en Italie (Rantsiou et al., 2005; Ricci et al., 2013) et en Thaïlande (Tosukhowong et al., 2012), de la viande de dinde (Barakat et al., 2000; Ricci et al., 2013) et de la farine de blé (Corsetti et al., 2007). L'ubiquité relativement bien établie de *L. garvieae* au sein des produits laitiers pourrait s'élargir à d'autres aliments.

II.1.3.2. Potentiel biotechnologique

Du fait du caractère récent de l'étude du potentiel biopréservateur de *L. garvieae*, peu d'éléments sont connus sur son potentiel biotechnologique. Néanmoins, plusieurs études ont été menées en rapport avec la fabrication fromagère.

Une différence notable entre les souches aquatiques de *L. garvieae* et les souches d'origine laitière réside dans le fait que ces dernières sont capables de fermenter le lactose (Fernández et al., 2010; Fortina et al., 2007; Teixeira et al., 1996). Une étude menée sur près de 50 isolats de *L. garvieae* provenant d'un fromage espagnol (Casín) a permis de mettre en évidence des propriétés technologiques proches de celles de *L. lactis*, couramment utilisé dans l'industrie laitière et disposant du statut GRAS (Fernández et al., 2010). Néanmoins, les souches de *L. garvieae* possèdent des singularités pouvant amener des propriétés sensorielles différentes et originales. Durant la fabrication fromagère, elles acidifient peu le milieu (faible production de D-lactate, L-lactate et acide acétique) et consomment également peu d'acides aminés comparées à des souches de *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* ou de *Enterococcus faecalis* (Alomar et al., 2008b; Fernández et al., 2010). A l'inverse, les souches de *L. garvieae* consomment plus de glucides et dérivés différents (notamment de l'inosine, du mannitol, de l'arbutine, du tagatose, de l'amygdaline et du gluconate) que les souches de *L. lactis* (Fernández et al., 2010). Au final, ces études ont permis de suggérer l'utilisation de *L. garvieae* en tant que ferment ou adjuvant pour l'industrie fromagère.

II.1.3.3. Spectre d'action inhibitrice

En fromage, *L. garvieae* possède un spectre d'action relativement large. Cette bactérie est capable de limiter la croissance des entérocoques, des entérobactéries, des lactobacilles, des *Leuconostoc* et des *Pseudomonas* (Delbes-Paus et al., 2010). Mais l'intérêt biopréservateur réside essentiellement dans le fait qu'elle puisse inhiber la croissance des staphylocoques à coagulase positive et spécialement *S. aureus*, dans le fromage et le lait cru, pasteurisé ou microfiltré (Alomar et al., 2008b; Delbes-Paus et al., 2010).

Récemment, Zhang et al. (2015) ont isolé une souche de *L. garvieae* présentant des capacités protectrices vis-à-vis de coliformes fécaux à partir d'intestins de porcelets en bonne santé, mais le mode d'action reste encore à caractériser.

Certaines souches de *L. garvieae*, productrices de bactériocines actives contre les pathogènes de genre *Clostridium* ou *Listeria*, pourraient également posséder un potentiel biopréservateur intéressant (Gabrielsen et al., 2014; Tosukhowong et al., 2012; Villani et al., 2001).

II.2. Contrôle de la croissance et de la virulence de *S. aureus* : intérêt des cultures protectrices

Les bactéries du genre *Staphylococcus* (staphylocoques) sont des coques à Gram + se développant en amas réguliers sans faculté de mobilité. A la fin du XIX^e siècle, des chercheurs isolent et identifient un staphylocoque à partir d'infections humaines : *Staphylococcus aureus* (Ogston, 1882; Rosenbach, 1884). Dans ce chapitre sont présentés les données concernant la pathogénicité de *S. aureus* et les mécanismes sous-jacents dans le cadre d'infections alimentaires, ainsi que les moyens de contrôle de ces effets néfastes potentiellement utilisables dans l'industrie alimentaire.

II.2.1. Caractéristiques principales de *S. aureus*

S. aureus est encore aujourd'hui une des bactéries les plus étudiées en raison de sa pathogénicité contre l'Homme. C'est l'espèce bactérienne pour laquelle le plus grand nombre de projets de séquençage de génomes ont été réalisés. En septembre 2015, plus de 5000 génomes de souches de *S. aureus* étaient déposés sur la plateforme du NCBI

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/reference/>), dont 72 génomes complets, 8 séquençages jusqu'à l'assemblage en chromosome, 3211 jusqu'à l'assemblage en scaffolds, 1795 jusqu'à l'assemblage en contigs. En moyenne, les génomes de *S. aureus* font 2,9 Mb, ont un G-C% de 32,8% et contiennent 2919 gènes qui codent pour 2816 protéines. Certaines souches contiennent également des plasmides (au maximum cinq identifiés dans la même souche). Au total, 166 plasmides différents de *S. aureus* ont été séquencés et annotés. La plupart d'entre eux confèrent des capacités de résistances multiples aux antibiotiques et agents antimicrobiens (Liu et al., 2013). Les souches de *S. aureus* peuvent contenir plusieurs îlots de pathogénicité, nommés SaPI (pour « *S. aureus* Pathogenicity Island »), porteurs de nombreux gènes de virulence (Kuroda et al., 2001).

II.2.2. Pathogénicité de *S. aureus* pour l'Homme

S. aureus est présente de manière commensale au niveau de la peau et des voies respiratoires de 20% à 30% des humains de façon permanente et de 60% des humains de façon transitoire (Kluytmans and Wertheim, 2005). La bactérie peut donc être transmise dans l'alimentation par l'Homme durant les étapes de fabrication, spécialement en cas de manque d'hygiène (Le Loir et al., 2003). Le réservoir animal peut également être à l'origine de contaminations de la matière première, particulièrement dans le cas d'espèces productrices de lait atteints de mammites. En effet, *S. aureus* est l'agent étiologique principal (30 à 40% des infections) des mammites à travers le monde (Medvedová and Valík, 2012).

Au niveau du système digestif humain, les infections à *S. aureus* peuvent engendrer des intoxications alimentaires. La dose infectieuse est estimée à au moins 100.000 bactéries ingérées (Schmid-Hempel and Frank, 2007). Mais la pathogénicité de *S. aureus* est avant tout liée à sa production d'entérotoxines (De Buyser et al., 2001; Le Loir et al., 2003; Simeão do Carmo et al., 2002), responsable de gastro-entérites, nausées, crampes abdominales, vomissements, hyper-salivations et diarrhées (Argudín et al., 2010; Balaban and Rasooly, 2000; Le Loir et al., 2003). De plus, *S. aureus* peut aussi engendrer des complications plus graves en cas de passage dans le sang.

Le Tableau 3 illustre l'épidémiologie des Toxi-Infections Alimentaires Collectives (TIAC) en France selon l'agent infectieux, recensée en 1999 et 2000. *S. aureus* a été identifié dans environ 17% des foyers infectieux et 26% des cas. Avec les bactéries du genre *Salmonella*, *S. aureus* est donc un des principaux agents étiologiques responsable de TIAC en France. Les TIAC à *S. aureus* en 1999 et 2000 ont engendré l'hospitalisation de 15% des personnes atteintes parmi les déclarées. En France, elles causent le décès de 0,02% des patients chez lesquels le germe est détecté, essentiellement des personnes immunodéprimées (ANSES, n° de saisine : 2011-SA-0117, 3 novembre 2011).

Tableau 3. Epidémiologie des TIAC déclarées aux directions départementales des affaires sanitaires et sociales ou des services vétérinaires selon l'agent causal en France en 1999 et 2000 (issu de Haeghebaert et al., 2002).

Agent causal	Foyer		Cas		Hospitalisations	
	Nombre	Pourcentage	Nombre	Pourcentage	Nombre	Pourcentage
<i>Salmonella enteridis</i>	200	39,2	1730	26,8	349	39,6
<i>Salmonella typhimurium</i>	51	10,0	588	9,1	78	8,9
<i>Salmonella</i> (autres sérotypes)	87	17,1	762	11,8	92	10,4
<i>S. aureus</i>	85	16,7	1651	25,6	252	28,6
<i>Clostridium perfringens</i>	27	5,3	792	12,3	4	0,5
<i>Bacillus cereus</i>	15	2,9	241	3,7	24	2,7
<i>Clostridium dinophysis</i>	8	1,6	79	1,2	NR	NR
<i>Clostridium botulinum</i>	8	1,6	NR	NR	NR	NR
<i>Campylobacter</i>	6	1,2	55	0,9	NR	NR
<i>Shigella sonnei</i>	7	1,4	NR	NR	NR	NR
<i>Shigella flexneri</i>	1	0,2	NR	NR	NR	NR
Coliformes	6	1,2	NR	NR	NR	NR
<i>Streptococcus</i>	1	0,2	NR	NR	NR	NR
Calicivirus	5	1,0	33	0,5	NR	NR
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1	0,2	2	0,0	NR	NR
Virus hépatite A	1	0,2	9	0,1	NR	NR
VTEC 0157	1	0,2	20	0,3	NR	NR
Histamine	20	3,9	92	1,4	28	3,2
Total	510		6451		881	

NR = Non renseigné (397 cas et 45 hospitalisations au total)

Dans le monde, les TIAC à *S. aureus* ont été référencées pour de nombreux produits alimentaires, dans diverses origines géographiques et dans divers contextes. Le tableau 4 illustre cette diversité à partir d'exemples de TIAC à grand nombre de cas (> 20) recensés dans le monde entre 1968 et

2009. Globalement, les aliments les plus concernés sont les produits laitiers et les autres aliments fermentés (Le Loir et al., 2003). La lutte contre la pathogénicité de *S. aureus* représente donc un enjeu de santé majeur, spécialement dans ces produits alimentaires.

Tableau 4. Exemples d'intoxications alimentaires référencées dues à *S. aureus* et survenus entre les années 1968 et 2009 dans le monde (adapté de Hennekinne et al., 2012).

Année	Lieu	Aliment	Nombre de cas
1968	Etats-Unis	Salade de poulet	1300
1971	Royaume-Uni	Saucisses et sandwiches au jambon	100
1975	Vol Japon -> Danemark	Jambon	197
1976	Vol Brésil -> USA	Eclairs au chocolat	80
1980	Canada	Caillé du lait	62
1982	Etats-Unis	Poulet farci et sandwiches au jambon et poulet	121
1983	Croisière, Caraïbes	Crème pâtissière	215
1984	Ecosse	Fromage au lait de brebis	27
1985	Europe	Lasagnes séchées	50
1985	Etats-Unis	Lait au chocolat 2%	> 1000
1986	Etats-Unis	Volailles et sauce	67
1989	Etats-Unis	Champignons en conserve	102
1990	Thaïlande	Eclairs	485
1992	Etats-Unis	Salade de poulet	1364
1998	Brésil	Poulet, rôti de bœuf, riz et haricots	4000
2000	Japon	Lait allégé en matières grasses	13420
2007	Autriche	Lait, lait au cacao, lait à la vanille	166
2008	France	Repas caribéen	47
2008	France	Salade de pâtes	100
2009	Japon	Crêpes	75
2009	France	Fromage au lait cru	23

Les aliments notés en gras sont ceux ordinairement préparés à base de lait ou produits laitiers.

II.2.3. Facteurs de virulence staphylococciques

II.2.3.1. Superantigènes

Les superantigènes sont des exotoxines parmi les plus étudiées chez *S. aureus* car elles sont responsables des principaux symptômes cliniques. Cette famille comprend les entérotoxines et la toxine TSST-1 (Toxic Shock Syndrom Toxin), ainsi que d'autres exotoxines aux rôles moins définis. Elles peuvent stimuler directement l'activité des lymphocytes T et induire leur prolifération polyclonale (Thomas et al., 2009). Cela va entraîner l'excrétion en masse par le système immunitaire de médiateurs inflammatoires qui vont causer des syndromes de choc toxique, létaux pour les cellules (Balaban and Rasooly, 2000; Hennekinne et al., 2012). Si

l'infection est localisée au niveau du système digestif, les symptômes seront ceux d'une intoxication alimentaire. Si l'infection est localisée dans le sang ou les organes, cela peut engendrer des chocs septiques aux conséquences plus graves.

II.2.3.1.1. Entérotoxines

Les entérotoxines sont les principales toxines responsables de TIAC à *S. aureus*. Les diverses souches de *S. aureus* codent pour un nombre variable d'entérotoxines différentes. A l'heure actuelle, 22 entérotoxines ont été caractérisées : 8 SE (pour *Staphylococcus aureus* Enterotoxin) et 14 SEI (SE-like), cf. Tableau 5.

Tableau 5. Liste de SEs and SEI identifiées chez diverses souches de *S. aureus* (adapté d'Argudín et al., 2010).

Toxine	Masse moléculaire (kDa)	Activité émétique	Gene
SEA	27,1	oui	<i>sea</i>
SEB	28,4	oui	<i>seb</i>
SEC	27,6	oui	<i>sec</i>
SED	26,9	oui	<i>sed</i>
SEE	26,4	oui	<i>see</i>
SEG	27,0	oui	<i>seg</i>
SEH	25,1	oui	<i>seh</i>
SEI	24,9	faible	<i>sei</i>
SEI/J	28,5	non-déterminée	<i>selj</i>
SE/K	26,0	non-déterminée	<i>selk</i>
SE/L	26,0	non	<i>sell</i>
SE/M	24,8	non-déterminée	<i>selm</i>
SE/N	26,1	non-déterminée	<i>seln</i>
SE/O	26,7	non-déterminée	<i>selo</i>
SE/P	27,0	non-déterminée	<i>selp</i>
SE/Q	25,0	non	<i>selq</i>
SER	27,0	oui	<i>ser</i>
SES	26,2	oui	<i>ses</i>
SET	22,6	faible	<i>set</i>
SE/U	27,1	non-déterminée	<i>selu</i>
SE/U2 (SEW)	non-déterminée	non-déterminée	<i>selu2</i>
SE/V	non-déterminée	non-déterminée	<i>selv</i>

Tous les gènes codants pour des entérotoxines sont situés sur des éléments génétiques accessoires, tels que les plasmides, des prophages ou des îlots de pathogénicité de la famille SaPI.

Généralement, les gènes codant pour les entérotoxines C et L sont portés par l'îlot de pathogénicité SaPI_n1 tandis que les gènes codant pour les entérotoxines G, N, I, M et O sont situés sur l'îlot de pathogénicité SaPI_n3 (Kuroda et al., 2001).

Parmi les souches responsables d'intoxications alimentaires, plusieurs études menées dans des zones géographiques différentes ont permis de révéler que l'entérotoxine la plus fréquemment identifiée en cas d'intoxication était l'entérotoxine A (SEA) et que les entérotoxines SEB, SEC et SED étaient également fréquemment impliquées (Casman, 1965; Cha et al., 2006; Chiang et al., 2008; Shimizu et al., 2000; Veras et al., 2008; Wieneke et al., 1993), y compris en France (Kérouanton et al., 2007). Pouvant franchir la barrière intestinale et passer dans le sang, les entérotoxines peuvent également causer (mais minoritairement comparé à TSST-1) des syndromes de choc toxique dans les organes et le sang (Dinges et al., 2000).

La prévalence des gènes de synthèse des entérotoxines est supérieure parmi les souches isolées d'intoxications alimentaires ou d'infections humaines par rapport à celles isolées d'autres écosystèmes, c'est-à-dire divers animaux mais aussi des ustensiles destinés aux soins cutanés (Chao et al., 2015). Chao et al. (2015) ont montré que des souches provenant d'intoxications alimentaires dues à du lait cru en Chine entre 2006 et 2013 possèdent en moyenne deux gènes différents codant pour des entérotoxines. La même moyenne a été établie pour les TIAC à *S. aureus* causées par d'autres aliments. Srinivasan *et al.* (2006) ont observé que près de 94% des souches de *S. aureus* isolées de lait de vaches (mammites) possédaient au moins un gène codant pour une entérotoxine.

II.2.3.1.2. Toxic Shock Syndrom Toxin 1 (TSST-1)

Découverte en 1978 (Todd et al., 1978), la toxine TSST-1 serait impliquée dans 75% des syndromes de choc toxique constatés (Murray et al., 2003). Elle est codée par le gène *tstI*, localisé dans l'îlot de pathogénicité SaPI_n1. La présence du gène *tstI* dans les souches est très variable selon les origines et les contextes étudiés. Ainsi, dans des souches isolées de pathologies cliniques humaines, la prévalence de *tstI* est comprise entre 20% et 91% (Becker et al., 2003; Daghistani et al., 2000; Endo et al., 2004; Nagao et al., 2009). Elle semble plus faible dans le cadre de mammites à *S. aureus*, généralement comprise entre 3% et 42% (Karahan et al., 2009; Zschöck et al., 2005, 2004) mais pouvant atteindre 75% selon les fermes (Akineden et al., 2001).

La toxine TSST-1 ne possède aucun pouvoir émétique et n'est pas considérée comme un vecteur de TIAC (Dinges et al., 2000). En revanche, cette toxine est considérée comme la principale responsable de syndromes de choc toxique dans l'écosystème vaginal.

II.2.3.2. Autres facteurs de virulence principaux

Une autre catégorie de toxines, les SSL (pour « Staphylococcal Superantigen-Like ») ont un mode d'action encore mal connu. Elles ne seraient cependant pas impliquées dans les TIAC. Contrairement aux superantigènes ciblant les lymphocytes, elles interfèreraient plutôt avec les immunoglobulines (Itoh et al., 2010; Langley et al., 2005), les monocytes et les neutrophiles (Baker et al., 2007; Bardoel et al., 2012; Chung et al., 2007).

Des gènes codant pour des leucotoxines, causant la nécrose des leucocytes, peuvent également être présents sur l'îlot de pathogénicité SaPI₃ (Kuroda et al., 2001).

Le génome de *S. aureus* contient généralement plusieurs gènes codant pour des hémolysines capables de dégrader les cellules sanguines.

Ajoutée aux toxines, la synthèse d'une capsule de fibrine joue un rôle crucial dans la virulence de *S. aureus* car elle le protège du système immunitaire de l'hôte et peut également améliorer l'adhésion de la bactérie (O'Riordan and Lee, 2004).

Enfin, *S. aureus* synthétise de nombreux autres facteurs de virulence tels que des adhésines, des fibronectines et des protéines de liaison aux cellules immunitaires ciblées.

II.2.4. Contrôle de la virulence et de la croissance de *S. aureus* dans l'alimentation

Au niveau alimentaire, ce sont les entérotoxines produites par *S. aureus* qui sont réellement problématiques et non la bactérie elle-même. En effet, les cellules de *S. aureus* ne résistent ni aux traitements stérilisants de l'industrie agroalimentaire, notamment les traitements thermiques, ni à l'acidité et aux diverses enzymes du système digestif humain. En revanche, les toxines staphylococciques sont très résistantes aux traitements thermiques. L'entérotoxine A et la toxine TSST-1, peuvent résister plus d'une heure à 100°C et plus de 12 h à des concentrations élevées en trypsine et en pepsine *in vitro* (Dinges et al., 2000; Li et al., 2011). Ces traitements entraînent néanmoins une diminution de l'activité sérologique de l'entérotoxine A, mais pas de la toxine

TSST-1. Après une pasteurisation classique (72°C, 15 secondes), les activités sérologiques de l'entérotoxine A et de l'entérotoxine D sont encore respectivement mesurées à 36% et 30% en lait entier, 56% et 30% en lait écrémé et 24% et 15% en crème (Hennekinne et al., 2012; Tatini, 1976). De manière générale, la plupart des entérotoxines résistent aux enzymes protéolytiques du système digestif humain (Hennekinne et al., 2012). Du fait de cette forte stabilité des toxines staphylococciques, empêcher leur production par *S. aureus* durant la fabrication et la conservation des aliments représente un enjeu majeur de santé publique.

Tableau 6. Conditions requises pour la croissance de *S. aureus* et la production d'entérotoxines (adapté de Hennekinne et al., 2012; Tatini, 1973).

Facteur	Croissance de <i>S. aureus</i>		Production d'entérotoxines par <i>S. aureus</i>	
	Optimale	Possible	Optimale	Possible
Température (°C)	37	7 à 48	37 à 45	10 à 45
pH	6 à 7	4 à 10	7 à 8	4 à 9.6
a_w	0,98	0,83 à 0,99	0,98	0,85 à 0,99
NaCl (%)	0	0 à 20	0	0 à 10
Potentiel redox	> +200 mV	< -200 mV à > +200 mV	> +200 mV	< -100 mV à > +200 mV
Atmosphère	Aérobie	Anaérobie / Aérobie	Aérobie (5 à 20% de O ₂)	Anaérobie / Aérobie

La production d'entérotoxines par *S. aureus* est dépendante des conditions environnementales (Tableau 6). Les conditions optimales de production d'entérotoxines par *S. aureus* sont proches des conditions optimales de croissance. Le Tableau 6 montre que *S. aureus* peut produire les entérotoxines dans un large panel de conditions abiotiques. La croissance de *S. aureus* varie également selon les combinaisons de paramètres physico-chimiques. Il a notamment été observé que la sensibilité de *S. aureus* à l'acidité et à la température pouvait dépendre des niveaux d' a_w , de concentration en NaCl et de concentration en O₂ (Barber and Deibel, 1972; Iandolo et al., 1964; Tilkens et al., 2015).

En conservation classique des aliments (réfrigération < 8°C ou congélation), la croissance de *S. aureus* serait très limitée et les entérotoxines ne seraient pas produites. En revanche, l'évolution des paramètres physico-chimiques durant la fabrication de fromages (ou d'autres aliments) permet théoriquement la production d'entérotoxines (Fox et al., 2004). Bien que ces paramètres varient selon le type de fromage, les entérotoxines staphylococciques ont été détectées durant la

fabrication de fromages de divers types et diverses origines (Delbes et al., 2006; Gómez-Lucía et al., 1992; Simeão do Carmo et al., 2002; Tatini et al., 1973, 1971). De ce fait, l'Union Européenne impose la détection des entérotoxines en fromage lorsque la concentration en *S. aureus* excède 10^5 UFC.g⁻¹ (European Community Regulation No 852/2004-853/2004). Dans le cas des fromages bénéficiant d'une Appellation d'Origine Protégée, les actions mises en œuvre pour contrôler la croissance et la virulence de *S. aureus* doivent respecter les spécifications du cahier des charges. Par exemple, les étapes de fabrication d'un fromage de type Saint-Nectaire avant la mise en cave (emprésurage à 30-33°C durant 18 à 50 min, pressage à 18-20°C durant 10 h, ressuyage à 6-10°C durant 24 h à 8 j) fixées par le cahier des charges (n°CE : FR-PDO-0117-01091) ne permettent pas d'empêcher la croissance de *S. aureus* et sa production d'entérotoxines. La modulation des paramètres physico-chimiques reste donc un mode de contrôle limité. Les méthodes de biopréservation offrent alors une autre possibilité intéressante.

II.3. Facteurs biotiques et abiotiques impliqués dans l'antagonisme de *L. garvieae* contre *S. aureus*

En 2008, Alomar *et al.* (2008b) soulignent que plusieurs souches de bactéries lactiques, dont *L. garvieae*, présentent des capacités d'inhibition de *S. aureus* en lait microfiltré. Plusieurs souches de *L. garvieae* présentent ainsi des capacités d'inhibition de *S. aureus* comparables à celles de souches de *L. lactis* ou d'*E. faecalis*. De manière similaire à ce qui avait été observé pour *L. lactis*, il est ensuite remarqué que plus le ratio *L. garvieae* / *S. aureus* est élevé, plus l'inhibition de *S. aureus* est forte (Alomar et al., 2008a). En présence de *L. garvieae*, la production d'entérotoxines par *S. aureus* ne s'effectue que dans des conditions limitées. En effet, dans un modèle faisant varier le pH, la température, la concentration en *L. garvieae* et le temps d'incubation, les entérotoxines n'ont pu être détectées en fromage qu'après 48 h de culture à 30°C et à pH 6,6 (Alomar et al., 2008a). L'agent inhibiteur a alors été recherché.

Il a tout d'abord été noté que *L. garvieae* acidifiait peu le milieu, contrairement aux autres bactéries lactiques. L'acidification n'est donc probablement pas impliquée dans ce mécanisme d'inhibition (Alomar et al., 2008b). En effet, *L. garvieae* provoque une baisse du pH de 0,32 à 0,84 selon les souches en 24 h en lait microfiltré, soit de 3 à 8 fois moins importante que la baisse

de pH provoquée par les souches de *L. lactis* et *E. faecalis*. De plus, cette inhibition a également été observée en milieu *in vitro* tamponné à 6,8 (Delbes-Paus et al., 2010).

La compétition nutritionnelle a également été écartée car *L. garvieae* modifiait peu la composition biochimique du lait, en comparaison avec *L. lactis* et *E. faecalis* (Alomar et al., 2008b). *L. garvieae* consomme des quantités notables de seulement quatre acides aminés après 24 h de croissance en lait (valine, thréonine, méthionine et isoleucine). Une supplémentation du milieu par ajout de ces acides aminés n'a eu aucun effet sur l'inhibition mais les quantités apportées lors de cette étude étaient faibles et potentiellement insuffisantes pour compenser la consommation. De plus, l'inhibition de *S. aureus* par *L. garvieae* a également été observée en milieu riche, du BHI (Delbes-Paus et al., 2010).

Un rôle des bactériocines est également improbable car les bactériocines déjà identifiées chez *L. garvieae* ne semblent pas avoir d'effet inhibiteur sur la croissance de *S. aureus* (Maldonado-Barragán et al., 2013; Tosukhowong et al., 2012; Villani et al., 2001, pp. 1–5).

De manière originale, le seul agent connu comme étant impliqué dans cette inhibition au début de ce travail de thèse est le peroxyde d'hydrogène produit par *L. garvieae* sous un niveau d'oxygénation suffisant. Son rôle dans cette inhibition a en effet été prouvé en lait et *in vitro* (Delbes-Paus et al., 2010). Cependant, le métabolisme aboutissant à la production de cette molécule et l'influence de l'environnement restent encore inconnus. La réponse de *S. aureus* à la production de peroxyde d'hydrogène par une bactérie lactique reste également à caractériser.

De plus, il a été noté que *S. aureus* était également inhibée par *L. garvieae* lorsque le niveau d'aération était faible, de manière moindre que lorsqu'il était élevé, alors que le peroxyde d'hydrogène était indétectable (Delbes-Paus et al., 2010). Les auteurs ont également observé que la suppression du H₂O₂ par ajout de catalase ne permettait pas de lever totalement l'inhibition de *S. aureus* en aération. Ceci suggère que le peroxyde d'hydrogène pourrait être produit sous faible oxygénation et / ou qu'au moins un autre effecteur serait mis en jeu dans cette inhibition.

III. Mécanismes moléculaires potentiellement impliqués dans l'interaction entre *S. aureus* et *L. garvieae*

Faute d'une bonne compréhension de leurs mécanismes d'action, les probiotiques pourraient être employés à mauvais escient et entraîner une augmentation du risque pathologique (Besselink et al., 2008). Une bonne connaissance des mécanismes d'interaction moléculaires mis en jeu est donc requise afin d'optimiser l'utilisation de souches microbiennes biopréservatrices ou probiotiques mais aussi de limiter les risques.

Comme discuté précédemment, l'antagonisme entre les bactéries lactiques et *S. aureus* peut être dû à différents effecteurs, modulés par de nombreux paramètres. Dans le cadre de l'antagonisme de *L. garvieae* vis-à-vis de *S. aureus*, le seul effecteur connu est le peroxyde d'hydrogène produit par *L. garvieae* lorsque l'oxygénation est suffisante. Cependant, l'existence d'autres effecteurs a été suggérée. La biopréservation des aliments contre *S. aureus* requiert le contrôle de la production des entérotoxines. Il est donc important de comprendre comment les mécanismes de virulence peuvent être modulés par les bactéries lactiques et quels sont les acteurs moléculaires mis en jeu dans ces divers processus physiologiques et métaboliques.

Les paragraphes suivants décrivent les acteurs moléculaires impliqués dans :

- la voie du H_2O_2 (III.1)
- la gestion du stress oxydatif qui découle de l'oxygénation (III.2)
- les diverses hypothèses concernant le ou les autre(s) effecteur(s) de cet antagonisme (III.3.)
- les mécanismes de virulence de *S. aureus* (III.4.)

Afin de mieux comprendre l'antagonisme de *L. garvieae* vis-à-vis de *S. aureus*, l'état des connaissances sur la modulation de ces acteurs moléculaires par l'interaction bactérie lactique / *S. aureus*, le niveau d'aération et la présence de H_2O_2 est également détaillé dans chaque paragraphe.

III.1. Métabolisme et voie du peroxyde d'hydrogène

III.1.1. Consommation du O_2 et production de H_2O_2

Généralement, la présence de O_2 dans le milieu ne cause pas directement de dommages cellulaires. Néanmoins, sa consommation par la cellule peut entraîner la formation de ROS, c'est-

à-dire des peroxydes organiques (H₂O₂, hydroperoxydes, etc.) et des radicaux libres (O₂⁻, OH⁻, etc.) qui sont généralement toxiques pour la cellule (Farr and Kogoma, 1991; Fridovich, 1998; Storz and Imlay, 1999). La formation de ROS est due à des réactions chimiques spontanées (Imlay et al., 1988) ou enzymatiques (Koopman et al., 2009; Massey et al., 1969; Messner and Imlay, 1999), spécialement en aérobiose. Certaines enzymes consomment l'oxygène du milieu en produisant des ROS alors que d'autres produisent des molécules peu ou pas nocives telles que de l'eau.

III.1.1.1. Acteurs moléculaires impliqués dans la consommation du O₂ et la production du H₂O₂

III.1.1.1.1. NADH oxydases (NOX)

La consommation de O₂ est principalement assurée par les NOX chez les bactéries (Higuchi et al., 2000; Tachon et al., 2010; Wolin et al., 1999). Leur expression est généralement stimulée par la présence d'oxygène. Leur rôle est également crucial pour certaines bactéries anaérobies strictes car elles permettent la détoxification du O₂ (Kawasaki et al., 2004). Il existe deux types de NADH oxydases (Condon, 1987; Miyoshi et al., 2003) : les NADH oxydases formant du H₂O₂ (NOX:H₂O₂) et celles formant du H₂O (NOX:H₂O). Les réactions enzymatiques catalysées par les NADH oxydases sont respectivement $2\text{NADH} + 2\text{H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}_2$ par les NOX:H₂O₂ ou $\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$ par les NOX:H₂O (Condon, 1987).

Dans le cas des bactéries lactiques, l'activité enzymatique des NOX:H₂O₂ est peu référencée et caractérisée. Ces enzymes n'ont été décrites que chez *Streptococcus mutans* et *Bifidobacterium bifidum* (Higuchi et al., 2000; Kawasaki et al., 2009). Au contraire, les NOX:H₂O ont été décrites dans un large panel de bactéries lactiques (Sasaki et al., 2014; Tachon et al., 2010; Y.-W. Zhang et al., 2012). Ainsi, la NOX:H₂O NoxE de *L. lactis* est la principale responsable de la consommation en O₂ durant le début de la phase exponentielle de croissance (Tachon et al., 2010). Cette consommation par NoxE entraîne une modulation du potentiel d'oxydo-réduction ou « potentiel redox » (Jeanson et al., 2009; Lopez de Felipe and Gaudu, 2009; Tachon et al., 2010). Les NADH-oxydases jouent également un rôle important en anaérobiose. Ainsi, la présence de cette enzyme peut être nécessaire pour le métabolisme fermentaire de *S. thermophilus* (Sasaki et al., 2014).

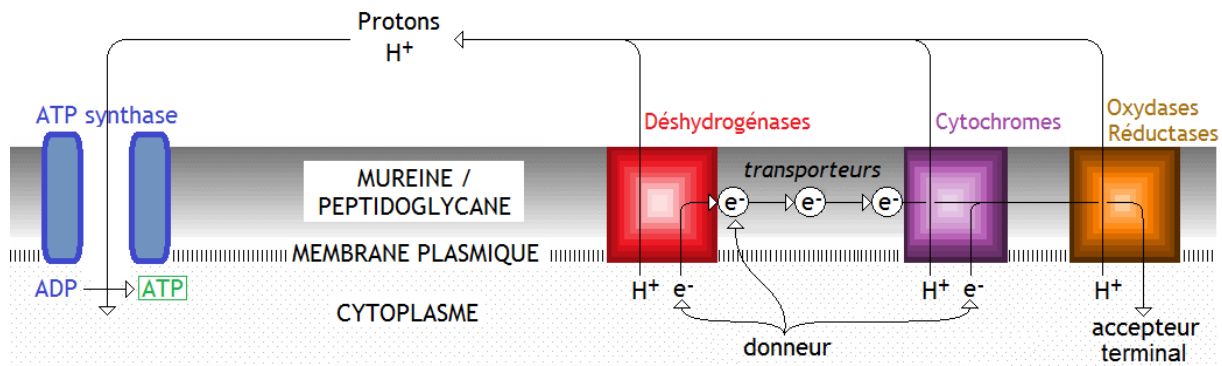
A l'inverse des bactéries lactiques, les bactéries du genre *Staphylococcus* ne possède généralement aucune enzyme de type NOX.

III.1.1.1.2. Chaîne respiratoire

La chaîne respiratoire, ou « ETC » (« ETC » = Electron Transport Chain), joue un rôle crucial dans la consommation de O_2 pour la plupart des bactéries (Calhoun et al., 1993; Portnoy et al., 2010). L'ETC peut engendrer la formation de ROS (principalement H_2O_2 et O_2^-) *via* des phénomènes d'auto-oxydation de composés flaviniques (FAD, FMN, etc).

Ce mécanisme est crucial chez les organismes en aérobiose car elle permet la formation d'un gradient de protons ensuite utilisé par l'ATP synthase pour former de l'ATP (Capaldi et al., 2000; Gogol, 1994). L'ETC bactérienne est complexe, car il peut y avoir différents donneurs d'électrons, accepteurs finaux, intermédiaires et ainsi y avoir plusieurs types d'ETC co-existantes dans la même cellule (Unden and Bongaerts, 1997). Une représentation simplifiée et générale est visible en Figure 2.

Figure 2. Organisation simplifiée de la chaîne respiratoire bactérienne.



Schématiquement, l'ETC commence avec le don d'un électron par un « donneur » grâce à l'action d'une déshydrogénase. Généralement le « donneur » est du NADH et l'enzyme associée est une NADH déshydrogénase. L'électron peut être pris en charge par des intermédiaires, transporté à une oxydase terminale puis transféré à un « accepteur terminal » (généralement du O_2 en aérobiose). Les intermédiaires peuvent être de deux types : les quinones isoprénoides et les cytochromes. Les quinones isoprénoides sont des molécules mobiles, essentiellement des ménaquinones synthétisées par les gènes « *men* » (Henkel et al., 2014; Rezaïki et al., 2008). Les

cytochromes sont des pigments nécessitant de l'hème pour fonctionner et synthétisés par les gènes « *cyd* » (Harbury and Loach, 1959; Morton and Sturtevant, 1964). Certains cytochromes sont mobiles, comme le cytochrome c, d'autres forment des complexes immobiles incorporés dans la paroi bactérienne (Pinheiro, 1994; Ramasarma et al., 1992; Schägger and Pfeiffer, 2000). A chaque action enzymatique, l'acceptation d'un électron permet le relargage d'un proton vers le milieu extracellulaire par des pompes à protons (Papa et al., 1994). Selon leur type, les enzymes et complexes de l'ETC peuvent jouer eux-mêmes le rôle de pompe à protons (Crofts et al., 2006; Ohnishi et al., 2010; Papa et al., 1994; Stolpe and Friedrich, 2004).

Les bactéries lactiques sont généralement adaptées au métabolisme fermentaire. De ce fait, certaines bactéries lactiques, comme *L. lactis*, ne peuvent naturellement pas réaliser de respiration aérobie sans apport d'hème (nécessaire à l'activité de certaines enzymes de l'ETC) car elles sont incapables d'en synthétiser (Duwat et al., 2001). Dans le cadre de l'ETC, la consommation en O₂ par *L. lactis* est principalement réalisée par les NADH déshydrogénases et les ménaquinones en phase stationnaire, anaérobiose et en aérobie (Tachon et al., 2010, 2009). Il existe deux types de NADH déshydrogénases chez *L. lactis* : NoxA et NoxB. Ces enzymes peuvent transférer l'électron à des ménaquinones (Tachon et al., 2009), servant de transporteurs d'électron vers un autre complexe ou enzyme. Bien que les ménaquinones jouent un rôle prépondérant dans l'ETC de *L. lactis* (Tachon et al., 2010), elles ne sont ni produites ni utilisées dans toutes les bactéries lactiques (Brasca et al., 2007).

Le métabolisme respiratoire aérobie des staphylocoques *via* l'ETC est encore relativement mal connu. Les gènes codant pour des NADH déshydrogénases sont absents du génome de la plupart des souches de *S. aureus*. Les électrons pourraient donc rentrer dans l'ETC directement au niveau des cytochromes ou des quinones isoprénoides (Götz and Mayer, 2013). Bien que leur lien avec l'ETC soit encore peu caractérisé, *S. aureus* possède d'autres déshydrogénases comme des lactate déshydrogénases (Yeswanth et al., 2013) ou des éthanol déshydrogénases (Artzatbanov and Petrov, 1990) qui pourraient également être à la base de l'ETC. Trois cytochromes ont été identifiés chez *S. aureus* mais aucun cytochrome c (Faller et al., 1980; Frerman and White, 1967; Taber and Morrison, 1964). Le transport des électrons serait donc essentiellement permis par des quinones isoprénoides. Le pool de quinones isoprénoides des staphylocoques est uniquement constitué de ménaquinones (Collins and Jones, 1981; Götz and Mayer, 2013). Deux ménaquinol oxydases, codées par les loci *cydAB* et *qoxABCD* (Hammer et al., 2013), fonctionnent en tant

qu'accepteur terminal d'électron dans l'ETC de *S. aureus* (Taber and Morrison, 1964; Tynecka et al., 1999). Chacune est capable d'assurer seule l'activité respiratoire de *S. aureus*.

III.1.1.1.3. SuperOxyde Dismutases (SOD)

Au cours des divers métabolismes en aérobie, la formation de ROS et radicaux libres peut survenir. Parmi eux, l'ion O_2^- , nommé « superoxyde », est extrêmement toxique pour la cellule bactérienne et se forme principalement à partir de phénomènes d'auto-oxydation au niveau de l'ETC (Massey et al., 1969; Messner and Imlay, 1999). La cellule nécessite donc l'intervention rapide d'enzymes pour prévenir la toxicité de cet ion en le transformant en une molécule moins toxique : le peroxyde d'hydrogène. La découverte récente de la protection directe des composants de l'ETC par les SOD dégradant les O_2^- générés dans le métabolisme eucaryote (Suthammarak et al., 2013) a encore appuyé l'importance de ces enzymes pour le métabolisme en aérobie.

Les enzymes de type SOD sont des métalloprotéines, largement conservées dans tous les domaines du vivant, catalysant la dismutation d'ions superoxydes pour former du peroxyde d'hydrogène (Chiang and Schellhorn, 2012; Condon, 1987). Ces enzymes sont définies par le métal contenu dans leur site actif, également impliqué dans la réaction. Chez les eucaryotes, les SOD sont généralement des Cu/Zn-SOD (Cuivre et Zinc), excepté dans les mitochondries où sont identifiées des Mn-SOD (Manganèse). En plus de ces deux types, les procaryotes peuvent posséder des Fe-SOD (Fer). L'internalisation et l'homéostasie des métaux est nécessaire pour la cellule, car ils assurent un rôle de cofacteur de l'activité des SOD (Karavolos et al., 2003; Nakonieczna et al., 2010; Niven et al., 1999).

Chez les bactéries lactiques, les types Mn-SOD ou Mn/Fe-SOD sont les plus fréquents (Bruno-Bárcena et al., 2010; De Angelis and Gobbetti, 1999; Sanders et al., 1995; Wegmann et al., 2007). Il a été observé que la croissance d'un mutant $\Delta sodA$ de *L. lactis* était fortement diminuée en aérobie alors qu'elle n'était pas affectée en anaérobie, confirmant le rôle crucial de SOD dans la détoxification des radicaux libres issus de l'ETC (Sanders et al., 1995). Parmi les bactéries lactiques productrices d' H_2O_2 , les enzymes SOD pourraient jouer un rôle crucial dans la protection contre le stress oxydatif et la production de H_2O_2 .

Chez les staphylocoques, les enzymes de type SOD sont généralement des Mn-SOD sensibles à la présence de manganèse et, dans une moindre mesure, à la présence de fer (Handke et al., 2013; Nakonieczna et al., 2010). Les staphylocoques possèdent également un homologue du gène *sodA*

mais *S. aureus* peut posséder un deuxième gène codant pour une SOD : *sodM* (Valderas and Hart, 2001). SodM a une activité SOD moindre que celle de SodA. Néanmoins, SodM peut remplacer SodA s'il est inactivé afin de maintenir l'intégrité cellulaire en cas de stress oxydatif en phase stationnaire de croissance (Valderas and Hart, 2001).

III.1.1.1.4. Pyruvate Oxydases (POX)

Les enzymes de type POX sont capables de dégrader le pyruvate à partir de phosphate et de O₂ pour former du H₂O₂ et du CO₂.

Dans le cas des bactéries lactiques, l'activité d'une pyruvate oxydase engendrant la formation de H₂O₂ a été la première fois constatée chez *Lactobacillus plantarum* (Murphy and Condon, 1984). La plupart des bactéries lactiques possèdent un seul (ou aucun) gène *pox* codant pour une pyruvate oxydase mais certaines peuvent en posséder plusieurs. Les gènes *pox*, ainsi que l'activité pyruvate oxydase, sont généralement induits par la présence de O₂ et de H₂O₂ (Murphy and Condon, 1984; Quatravaux et al., 2006). Néanmoins, il a été observé que l'activité pyruvate oxydase n'était pas toujours corrélée avec une détection de peroxyde d'hydrogène (Bauer et al., 2000), suggérant d'autres mécanismes de production.

Bien que *S. aureus* ne produise pas de peroxyde d'hydrogène de manière détectable, cette bactérie possède un gène codant pour une pyruvate oxydase, *cidC* encore relativement mal décrit (Patton et al., 2005).

III.1.1.1.5. Monooxygénases

D'autres enzymes peuvent également consommer du O₂ sans nécessairement produire du H₂O₂. C'est le cas des monooxygénase à partir de divers substrats. Les L-lactate-2-monooxygénases (LOX) dégradent le lactate et consomment du O₂ pour former de l'acétate, du H₂O et du CO₂ (Lockridge et al., 1972). Ces enzymes sont très proches des L-lactate oxydases (LctO). Néanmoins, la réaction chimique catalysée par ces dernières engendre plutôt la formation de pyruvate et de H₂O₂ (Maeda-Yorita et al., 1995).

Les bactéries lactiques possèdent généralement au moins un gène codant pour une L-lactate-2-monooxygénase. Les staphylocoques ne possèdent généralement pas d'oxydase mais certaines monooxygénases au rôle peu défini ont pu être identifiées.

III.1.1.1.6. Autres

Récemment, il a été démontré que le gène *spxA1*, codant pour un régulateur transcriptionnel impliqué dans la réponse oxydative de plusieurs espèces de streptocoques, jouait un rôle dans la production de H₂O₂ de *Streptococcus sanguinis* (Chen et al., 2012). Le mécanisme reste inconnu. Des homologues du gène *spxA1* ont été identifiés dans plusieurs bactéries lactiques dont *L. lactis* ou *L. garvieae*, et également dans des staphylocoques dont *S. aureus*.

III.1.1.2. Effet de l'interaction bactérienne, de l'aération et de la présence de H₂O₂ sur les mécanismes de consommation de O₂ et de production de H₂O₂ de bactéries lactiques et de S. aureus

Plusieurs études ont exploré l'effet de l'interaction bactérienne, de l'aération et de la présence de H₂O₂ sur les mécanismes de consommation de O₂ et production de H₂O₂ de bactéries lactiques et de *S. aureus* (Tableau 7, résultats généraux en annexe 1).

Le Tableau 7 montre que la bactérie antagoniste *L. lactis* est affectée par la présence de *S. aureus* et par l'aération. La plupart des gènes relatifs à la consommation de O₂ (ETC et *noxE*) sont surexprimés en aération et en présence de *S. aureus*. Bien que *L. lactis* ne produise pas de H₂O₂ dans ces conditions, *sodA* est surexprimé en aération. En parallèle, *poxB* semble réprimé par la présence de *S. aureus*, ce qui pourrait constituer un mécanisme de défense de la bactérie pathogène.

Au niveau de *S. aureus*, *sodA* serait surexprimé en aération et en présence de H₂O₂, probablement pour défendre la bactérie du stress oxydatif engendré par ces conditions. Cependant, *sodA* est fortement réprimé par la présence de *L. lactis in vitro*, ce qui pourrait accentuer l'effet inhibiteur. L'expression d'autres gènes de ces bactéries (*sodM*, *lox*, *noxB*, *cydD*, *menC*, *menH*) n'est pas particulièrement modulée par ces divers paramètres.

Tableau 7. Effet de l'interaction bactérienne, de l'aération et de la concentration en H₂O₂ sur l'expression de gènes et protéines de *S. aureus* ou *L. lactis* impliqués dans la consommation du O₂ et production de H₂O₂.

	Effet de l'interaction bactérienne			Effet de l'aération			Effet du H ₂ O ₂ sur <i>S. aureus</i>				
	sur <i>S. aureus</i>		sur <i>L. lactis</i>	sur <i>S. aureus</i>		sur <i>L. lactis</i>					
Con- texte	A	B	A	D	E	C	F	G	H	I	E
<i>noxE</i>						+++					
<i>noxA</i>						+++					
<i>cydA</i>			+			-	+	++	+		
<i>cydB</i>						-		++			
<i>cydC</i>			+			-	+				
<i>menB</i>			+	+		+					
<i>menD</i>			+			+					
<i>menE</i>			+			+					
<i>menF</i>			+			+	- / +				
<i>menX</i>			+			+					
<i>poxB / cidC</i>		- / +	-					+			
<i>sodA</i>	--	+		++	+	++	+		+		+

Les effets positifs ou négatifs sont indiqués par des signes « + » ou « - ». Les signes « - / + » un effet variable selon un autre paramètre (généralement le temps) ou des données contradictoires dans la même expérience.

A = étude *in vitro* à 30°C et pH 6,6 de l'effet de *L. lactis* sur le transcriptome de *S. aureus* (Even et al., 2009) ou de *S. aureus* sur le transcriptome de *L. lactis* (Nouaille et al., 2009)

B = étude en modèle fromage de l'effet de *L. lactis* sur le transcriptome de *S. aureus* (Cretenet et al., 2011)

C = étude *in vitro* de l'effet de l'aération (cultures agitées / statiques) sur le transcriptome et protéome de *L. lactis* (Pedersen et al., 2008)

D = étude *in vitro* du passage en anaérobiose (agité à statique) sur le transcriptome et protéome de *S. aureus* (Fuchs et al., 2007)

E = Base de donnée SAMMD référençant les effets de divers stress sur le transcriptome de *S. aureus* (Nagarajan and Elasri, 2007)

F = étude *in vitro* de l'effet d'une injection de H₂O₂ (5 mM) sur le transcriptome de cellules de *S. aureus* provenant de cultures agitées en milieu de phase exponentielle (Palazzolo-Ballance et al., 2008)

G = étude *in vitro* du transcriptome de *S. aureus* 20 min après injection de H₂O₂ à 10 mM (Chang et al., 2006)

H = étude *in vitro* du transcriptome de *S. aureus* après une injection progressive durant 10 min de H₂O₂ à 10 mM (Deng et al., 2014)

I = Effet d'une exposition de 10 mM de H₂O₂ sur le transcriptome de *S. aureus*, base de donnée Aureolib (Fuchs et al., 2013).

III.1.2. Résistance et dégradation des peroxydes organiques (et spécialement H₂O₂)

Chez les bactéries, la dégradation des peroxydes toxiques produits en aérobiose, notamment du H₂O₂, peut s'effectuer grâce à plusieurs systèmes de peroxydases. Les peroxydases principalement impliquées dans la dégradation du H₂O₂ sont les catalases et les peroxyrédoxines assistées de systèmes antioxydants. En parallèle, les protéines de la famille OsmC / Ohr peuvent dégrader les peroxydes toxiques mais ont une faible affinité pour le peroxyde d'hydrogène.

III.1.2.1. Acteurs moléculaires impliqués dans la dégradation des peroxydes

III.1.2.1.1. Catalase (Kat)

Les catalases sont des enzymes bien caractérisées pour leur rôle de détoxification et de dégradation spécifiques du H₂O₂. La réaction enzymatique catalysée est $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ (Mandell, 1975). Tous les genres bactériens ne possèdent pas de gènes *kat*, codant pour une catalase, mais des gènes de ce type sont identifiés dans des bactéries aux origines très différentes. Certaines d'entre elles possèdent plusieurs gènes *kat* (Bandyopadhyay and Steinman, 2000; Bidaud et al., 2012; Engelmann et al., 1995; Lee et al., 2005).

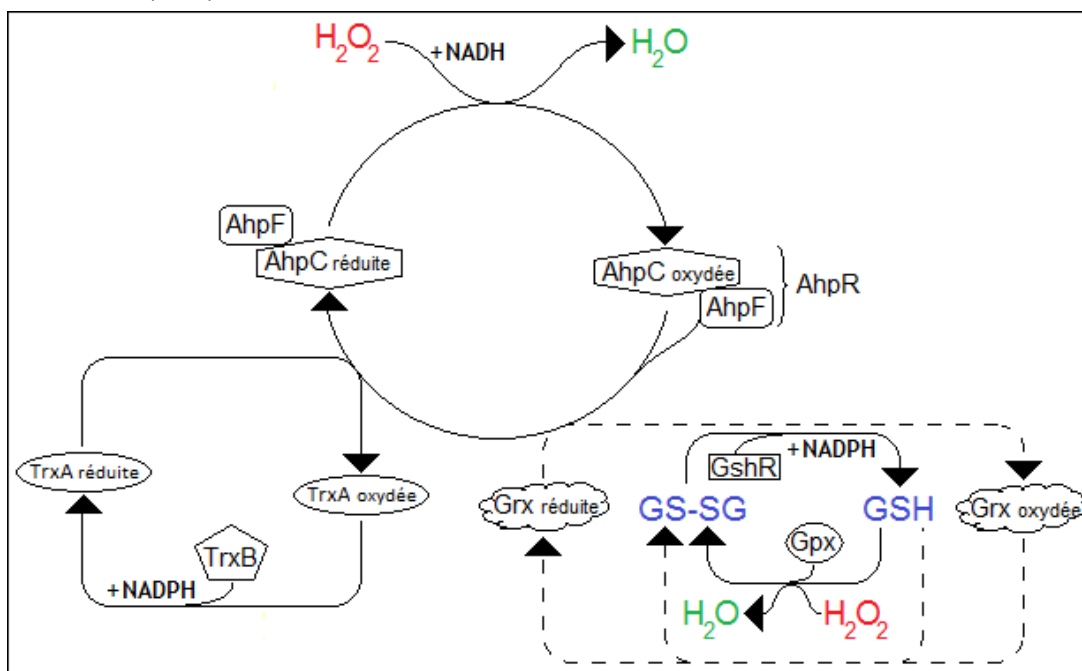
La majorité des bactéries lactiques ne possède aucun gène codant pour une catalase et utilise donc les autres systèmes pour se protéger du H₂O₂ (Mishra and Imlay, 2012).

A l'inverse, les staphylocoques possèdent un ou deux gènes codant pour une catalase : *katA* et *katB* (Blaiotta et al., 2010). Seul *katA* est présent dans le génome des souches de *S. aureus*. Un autre gène, homologue à *katB*, a été détecté dans la sous-espèce *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius*, mais sans activité catalasique associée (Sanz et al., 2000). La catalase KatA n'est pas essentielle (Horsburgh et al., 2001b; Messina et al., 2002), car les autres peroxydases peuvent compenser son absence (Cosgrove et al., 2007). Néanmoins, KatA est l'enzyme principalement impliquée dans cette dégradation. En effet, lorsque la concentration en H₂O₂ excède 10⁻⁵ M, d'autres enzymes comme les peroxyrédoxines sont saturées (Seaver and Imlay, 2001).

III.1.2.1.2. Peroxyrédoxines et systèmes régénérateurs

Les peroxyrédoxines sont des protéines capables de dégrader du H_2O_2 lorsqu'elles s'oxydent. Elles peuvent à nouveau se réduire grâce aux systèmes antioxydants impliquant diverses enzymes et un tripeptide, le glutathion. En parallèle, la glutathion peroxydase peut également catalyser la dismutation du H_2O_2 en H_2O . Ces mécanismes sont résumés par la figure 3 et expliqués dans les paragraphes suivants. Contrairement à la catalase ayant un spectre d'action restreint au H_2O_2 , les peroxyrédoxines et la glutathion peroxydase peuvent cibler tous les peroxydes organiques ($R-OOH$), produisant alors des alcools ($R-OH$).

Figure 3. Mode d'action simplifié des peroxyrédoxines (AhpR), thiorédoxines (Trx), glutarédoxines (Grx) vis-à-vis du H_2O_2 .



AhpR = Peroxyrédoxine AhpR (AhpC + AhpF) ; AhpC = Alhylhydroperoxydase C ; AhpF = Alhylhydroperoxydase F ; TrxA = Thiorédoxine ; TrxB = Thiorédoxine réductase ; Grx = Glutarédoxine ; GS = Glutathion (GSH = réduit, GS-SG = oxydé) ; GshR = Glutathion réductase ; Gpx = Glutathion peroxydase.

Ne disposant généralement pas de catalase, les bactéries lactiques dégradent le H_2O_2 principalement *via* les peroxyrédoxines (Mishra and Imlay, 2012).

Chez *S. aureus*, la dégradation du H_2O_2 se fait principalement *via* l'action compensatoire de la catalase et des peroxyrédoxines (Cosgrove et al., 2007).

III.1.2.1.2.1. Peroxyrédoxine AhpR

La principale peroxyrédoxine du domaine bactérien, AhpR (Alkyl hydroperoxyde Reductase) est formée de deux sous-unités : AhpC, l'unité catalytique responsable par son oxydation de la réduction du H₂O₂, et AhpF, qui peut réduire à nouveau AhpC et assurer alors sa régénération (Dip et al., 2014; Jönsson et al., 2007; Poole and Ellis, 1996; Wood et al., 2003). La réduction d'une molécule de H₂O₂ grâce au complexe AhpR nécessite un apport en NADH et libère une molécule de H₂O. Le complexe AhpR peut donc réduire le peroxyde d'hydrogène et régénérer son activité grâce à un apport d'énergie (NADH).

III.1.2.1.2.2. Thiorédoxines (TrxA) et thiorédoxine réductase (TrxB)

Les thiorédoxines sont des petites protéines d'oxydo-réduction impliquées dans la réponse aux ROS et conservées dans tous les domaines du vivant (Holmgren, 1989; Lu and Holmgren, 2014). La thiorédoxine fournit des électrons aux peroxyrédoxines et permet alors leur régénération sous forme réduite (Lu and Holmgren, 2014). La thiorédoxine réductase est une flavoprotéine fonctionnant en homodimères. C'est la seule enzyme connue pouvant réduire en retour la thiorédoxine (Hirt et al., 2002; Williams et al., 2000).

III.1.2.1.2.3. Glutarédoxines (Grx) et glutarédoxine réductase

Les glutarédoxines sont des petites protéines d'oxydo-réduction au fonctionnement similaire à celui de thiorédoxines. Cependant, le système des glutarédoxines n'est pas conservé chez toutes les bactéries (Holmgren, 1989). Contrairement aux thiorédoxines nécessitant une enzyme pour être réduites, les glutarédoxines sont réduites par un cofacteur non-enzymatique, le glutathion (Gleason and Holmgren, 1988; Holmgren, 1989). Suite à cette réaction, le glutathion sous forme oxydé peut être réduit par l'action d'une enzyme, la glutathion réductase codée par le gène *gshR* ou *gor*. La présence du système glutarédoxine-glutathion est minoritaire chez les staphylocoques et les bactéries lactiques (Holmgren, 1989; Lu and Holmgren, 2014). Dans ce cas, le système thiorédoxine serait d'une importance cruciale pour la survie durant un stress oxydatif. D'autres rédoxines, les bacillirédoxines, ont été récemment identifiées chez *S. aureus* et *B. subtilis* (Loi et al., 2015). Leur rôle pourrait être similaire à celui des thiorédoxines ou glutarédoxines mais est encore mal connu.

III.1.2.1.2.4. *Glutathion peroxydase*

En plus de son implication dans le système glutarédoxine-glutathion, le glutathion peut être oxydé par la glutathion peroxydase (Gpx / Gpo), une enzyme de la famille des sélénoprotéines et conservée dans tous les domaines du vivant (Margis et al., 2008). La réaction catalysée par cette enzyme est : $2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GS-SG} + 2\text{H}_2\text{O}$ (Margis et al., 2008). Cette enzyme est généralement codée par les bactéries lactiques et les staphylocoques. Ainsi, son activité permettrait une voie supplémentaire de dégradation du H_2O_2 en présence de glutathion.

III.1.2.1.3. Protéines de la famille Ohr / OsmC

Les protéines Ohr (Organic Hydroperoxide Resistance) et OsmC (Osmotically-induced) sont des homologues structuraux à activité peroxydase (Cussiol et al., 2010, 2003; Lesniak et al., 2003, 2002; Oliveira et al., 2006). Ces deux familles de protéines présentent néanmoins des différences en termes de régulation et de fonction physiologique (Atichartpongkul et al., 2001; Lesniak et al., 2003). En effet, les gènes *ohr* sont induits par l' O_2 , la présence d'hydroperoxydes organiques et impliqués dans leur dégradation, alors que *osmC* ne serait pas induit par le stress oxydatif mais plutôt par le stress osmotique (Atichartpongkul et al., 2001; Cussiol et al., 2003; Dubbs and Mongkolsuk, 2007).

Le système Ohr se compose de deux protéines, OhrA et OhrR. Bien que ce système semble largement conservé dans le domaine bactérien et ait été décrit dans de nombreuses espèces, la nature des hydroperoxydes organiques préférentiellement ciblés diffère selon les espèces (Atichartpongkul et al., 2010, 2001; Caswell et al., 2012; Chuchue et al., 2006; Clair et al., 2013; da Silva Neto et al., 2012; Fontenelle et al., 2011; Fuangthong et al., 2001; Klomsiri et al., 2005; Lee and Helmann, 2006; Lesniak et al., 2003; Li et al., 2014; Mongkolsuk et al., 1998; Oh et al., 2007; Panmanee et al., 2002; Soonsanga et al., 2008; Völker et al., 1998). OhrR est un répresseur transcriptionnel se liant à l'opérateur du gène *ohrA* en absence de stress oxydatif (Fuangthong et al., 2001; Hong et al., 2005; Newberry et al., 2007). La présence de peroxydes organiques déclenche le détachement de OhrR du promoteur et l'activation de la transcription de *ohrA*. OhrA agirait ensuite comme un homologue fonctionnel (mais pas structural) des peroxyrédoxines et pourrait alors dégrader les hydroperoxydes organiques. Des études *in vitro* ont confirmé que les protéines OhrA étaient des peroxydases capable de dégrader les hydroperoxydes organiques (Cussiol et al., 2003; Lesniak et al., 2003). Cependant, le système OhrRA n'est pas ou peu induit

par la présence de H₂O₂ (Mongkolsuk et al., 1998; Panmanee et al., 2002) et peu ou pas impliqué dans sa dégradation (Ochsner et al., 2001; Rincé et al., 2001; Saikolappan et al., 2009; Si et al., 2015). Le système Ohr serait donc plutôt impliqué dans la résistance spécifique aux peroxydes organiques, et donc dans la résistance aux hauts niveaux d'O₂, mais pas dans la résistance au peroxyde d'hydrogène.

Chez les bactéries lactiques, plusieurs homologues de gènes de la famille *osmC* / *ohr* ont été identifiés. Bien que plusieurs homologues des gènes de la famille *osmC* / *ohr* aient été identifiés et parfois différenciés chez les staphylocoques, ils ont été peu décrits.

III.1.2.2. Effet de l'interaction bactérienne, de l'aération et de la présence de H₂O₂ sur les mécanismes de dégradation des peroxydes de bactéries lactiques et de *S. aureus*

Plusieurs études ont exploré l'effet de l'interaction bactérienne, de l'aération et de la présence de H₂O₂ sur les mécanismes de bactéries lactiques et de *S. aureus* impliqués dans la dégradation des peroxydes (Tableau 8, résultats généraux en annexe 1).

Tableau 8. Effet de l'interaction bactérienne, l'aération et la concentration en H₂O₂ sur l'expression de gènes et protéines de *S. aureus* ou *L. lactis* impliqués dans la résistance aux peroxydes dont le H₂O₂.

	Effet de l'interaction bactérienne			Effet de l'aération			Effet du H ₂ O ₂ sur <i>S. aureus</i>				
	sur <i>S. aureus</i>		sur <i>L. lactis</i>	sur <i>S. aureus</i>		sur <i>L. lactis</i>					
Con- texte	A	B	A	D	E	C	F	G	H	I	E
<i>katA</i>	---	--		+	+						+
<i>ahpC</i>						++	+			+	+
<i>ahpF</i>	--	-				++	++				+
<i>trxA</i>		-					+		+		+
<i>trxB</i>		-	+				+		+		+
<i>gshR</i>						++					
<i>gpx</i> / <i>gpo</i>						++	+				+
<i>osmC</i> / <i>ohr</i>						+++	- / +	+			

Pour la légende et les références, cf. Tableau 7.

L'aération a un effet inducteur sur les gènes de dégradation des peroxydes de *L. lactis*, ce qui suggère un contrôle des peroxydes autogènes de *L. lactis* via ces gènes.

Le peroxyde d'hydrogène a un effet positif sur l'expression de la plupart des gènes de dégradation du H₂O₂ de *S. aureus*, à l'exception notable de *katA* qui est essentiellement induit en aération. Ce gène, comme *ahpF* dans une moindre mesure, est également fortement réprimé par la présence de *L. lactis*. En parallèle, la présence de *L. lactis* induit une forte répression de gènes cruciaux pour la défense de *S. aureus* contre les peroxydes issus du métabolisme en aérobiose, dont le H₂O₂ : *katA*, *ahpF*, mais aussi *trxA* et *trxB*. L'effet inhibiteur de *L. lactis* contre *S. aureus* n'implique pourtant pas le peroxyde d'hydrogène.

III.2. Réponse au stress oxydatif

Dans le domaine bactérien, la réponse au stress est liée à plusieurs gènes et à leurs régulateurs. Beaucoup d'acteurs de la réponse au stress ont un rôle pléiotropique et répondent à des stress de nature différente aussi bien chez *S. aureus* (Chastanet et al., 2003; Chatterjee et al., 2009, 2005; Singh et al., 2007; Wolf et al., 2008) que chez les bactéries lactiques (Arnau et al., 1996; Dijkstra et al., 2014; Frees et al., 2003; Kuwana and Yamamoto, 2012; Pedersen et al., 2008; Ricciardi et al., 2012). Le Tableau 9, issue de la base de données SAMMD (*Staphylococcus aureus* Microarray Meta-Database), illustre ce phénomène concernant *S. aureus*.

La réponse du stress est gérée par quatre mécanismes principaux aux rôles distincts : les protéines chaperonnes, le complexe protéolytique Clp, la réponse SOS, ainsi que les divers régulateurs du stress oxydatif.

Tableau 9. Principaux facteurs de stress induisant ou réprimant l'expression de gènes de réponse au stress de *S. aureus*, données issues du projet SAMMD (Nagarajan and Elasri, 2007).

	Acidité	Acides gras (2)	Acide peracétique	Anaérobiose	Antibiotiques et bactériocines (14)	Anti-inflammatoires (1)	Anti-tumoraux (2)	Biocides (1)	Chloration	Chlorure de berberine	Cold-shock	H ₂ O ₂	HClO	Haute température	Stress nitrite	Stress nitrosatif	Vitamines (1)
<i>hrcA</i>					+	-	-					-	-	+	+		+
<i>rpoB</i>					-		+					-					-
<i>ctsR</i>	+	-			+	-						~		+	+	+	+
<i>recA</i>					+							+			+		
<i>lexA</i>			+		+		-				+	+			+		
<i>groES</i>		-			~	-					-	-	-	+			+
<i>groEL</i>		-		+	+	-					-	~		+			+
<i>dnaK</i>		~			+	-						~		+			+
<i>dnaJ</i>		+			+	-								+	+		+
<i>grpE</i>	+	-			+	-	-					-		+			+
<i>clpP</i>		-		+	~						-	+		+			+
<i>clpB</i>	+	~			+			-				-	-	+		+	+
<i>clpC</i>	+	-			+		-				-	+		+	+		+
<i>clpQ</i>					~					-					+		
<i>clpL</i>	+		+	+	~		+	-	+			~		-	-	+	
<i>clpX</i>															+		
<i>clpY</i>					~					-							+

Le nombre de composés différents testés pour les catégories de facteur concernées est indiqué entre parenthèse. Le signe indique le sens de la régulation : « + » pour une induction, « - » pour une répression et « ~ » pour un effet variable selon le composé précis ou selon les variations d'un autre paramètre (concentration du composé ou temps d'incubation).

III.2.1. Protéines chaperonnes

Les chaperonnes moléculaires sont des protéines conservées à travers tous les domaines du vivant (Genevaux et al., 2007; Zeilstra-Ryalls et al., 1991). Les principales chaperonnes, conditionnant la maturation des protéines jusqu'à leur structure finale en encapsulant la protéine ciblée, sont les chaperonines (Taguchi, 2005; Thirumalai and Lorimer, 2001). D'autres chaperonnes sont plutôt impliquées dans les modifications post-transcriptionnelles et sont appelées « chaperonnes de l'ARN ».

III.2.1.1. Chaperonines

Les principales chaperonines bactériennes forment le complexe « GroESL » (GroES et GroEL) et le « système DnaK » (DnaK, DnaJ et GrpE), présents chez les staphylocoques et les bactéries lactiques. GroESL est un complexe à haut poids moléculaire (de l'ordre du mégadalton), codé à partir d'un opéron contenant les gènes *groES* et *groEL* (Chen et al., 2013; Grallert and Buchner, 2001; Taguchi, 2015). La chaperonne DnaK est une protéine à faible poids moléculaire (70 kDa) associée aux co-chaperonnes DnaJ et GrpE pour former le « système DnaK ». Les trois gènes sont co-transcrits au sein d'un même opéron avec le répresseur des gènes de réponse au stress thermique, *hrcA* (Kuroda et al., 1999; Schumann, 2003; van de Guchte et al., 2002).

Les chaperonnes jouent donc un rôle clef pour l'intégrité de la cellule, spécialement en condition de stress, ceux-ci pouvant engendrer de mauvais repliements. Il est aujourd'hui établi que DnaK est impliqué dans la réponse cellulaire au stress osmotique (Meury and Kohiyama, 1991) et dans la résistance au H₂O₂ (Rockabrand et al., 1995; Singh et al., 2007). Chez les staphylocoques, le système DnaK peut réguler positivement l'expression de *clpL* et négativement celle de *sodA*, *hld* / *RNAIII*, *clpB*, *clpC*, *clpP* ou encore *ctsR* (Singh et al., 2012), confirmant le rôle majeur de DnaK dans la réponse au stress de *S. aureus*.

Les bactéries lactiques et les staphylocoques possèdent d'autres protéines chaperonnes moins conservées dans le vivant et aux rôles encore peu caractérisés, tels que le Trigger Factor impliqué dans le repliement immédiat des protéines nouvelles synthétisées (Hoffmann et al., 2010; Ullers et al., 2003) ou encore Hsp33 impliquée dans l'adaptation au potentiel d'oxydo-réduction (Ilbert et al., 2007; Jakob et al., 1999; Winter et al., 2005).

III.2.1.2. *Chaperonnes de l'ARN*

Dans le domaine bactérien, la principale chaperonne de l'ARN est Hfq (Vogel and Luisi, 2011). Cette chaperonne conditionne l'interaction entre des ARN non-codants et des ARNm, modulant alors la traduction de ces derniers. Chez *S. aureus*, Hfq contrôle l'expression d'environ 4% du transcriptome, dont une régulation positive de régulateurs de stress et de virulence comme *rpoB*, *sarA* et *sarZ* et *trxA* et une régulation négative de la superoxyde dismutase *sodM* (Liu et al., 2010). Cependant, Hfq n'est pas ubiquitaire dans le domaine bactérien et aucun homologue de Hfq n'a été identifié chez les bactéries lactiques. Une autre chaperonne de l'ARN est codée par les bactéries lactiques et les staphylocoques et serait ubiquitaire, YbeY (Rasouly et al., 2009). Bien qu'elle ne soit pas homologue structuralement à Hfq (Oganesyan et al., 2003; Penhoat et al., 2005; Schumacher et al., 2002; Vogel and Luisi, 2011; Zhan et al., 2005), elle partagerait de fortes similarités de fonction et de cibles (Davies et al., 2010; Davies and Walker, 2008; Vercruysse et al., 2014). Cependant, son rôle est encore mal caractérisé et peu étudié.

III.2.1.3. *Effet de l'interaction bactérienne, de l'aération, de la présence de H₂O₂ et de la température sur l'expression des protéines chaperonnes de bactéries lactiques et de S. aureus*

Plusieurs études ont exploré l'effet de l'interaction bactérienne, de l'aération et de la présence de H₂O₂ sur l'expression des protéines chaperonnes de bactéries lactiques et de *S. aureus*. Chez les bactéries lactiques, les réponses aux stress oxydatif et thermique ont été suggérées comme proches (Dijkstra et al., 2014). Or, l'effet d'un stress thermique sur *L. garvieae* a déjà été exploré. Ces effets sont décrits dans le Tableau 10 (résultats généraux en annexe 1).

Chez *S. aureus*, l'expression de *groES* et *groEL* peut être modifiée par l'aération et la présence de H₂O₂. Cependant, ces effets semblent variables selon la durée et les conditions testées. En fromage, *dnaK* et dans une moindre mesure *dnaJ* sont surexprimés en présence de *L. lactis*. Aucune régulation particulière de *hfq* ou *ybeY* n'a été observée dans ces contextes.

Chez *L. garvieae*, la répression de *groES* et *groEL* à 37°C comparé à 18°C confirmerait leur implication dans la réponse au stress thermique. Les stress thermique et oxydatif induisant des réponses proches chez les lactocoques (Dijkstra et al., 2014), *groES* et *groEL* pourraient avoir un rôle dans la réponse de *L. garvieae* au stress oxydatif.

Tableau 10. Effet de l'interaction bactérienne, de l'aération, de la concentration en H₂O₂ et de la température sur l'expression de gènes et protéines de *S. aureus*, *L. lactis* et *L. garvieae* codant pour les principales chaperonnes de réponse au stress.

	Effet de l'interaction bactérienne			Effet de l'aération			Effet du H ₂ O ₂ sur <i>S. aureus</i>					Effet thermique sur <i>L. garvieae</i>	
	sur <i>S. aureus</i>	sur <i>L. lactis</i>		sur <i>S. aureus</i>	sur <i>L. lactis</i>								
Con- texte	A	B	A	D	E	C	F	G	H	I	E	J	K
<i>groES</i>							- / +					-	
<i>groEL</i>				- / +	-		- / +				- / +	-	
<i>dnaK</i>		++		+									
<i>dnaJ</i>		+	-										
<i>grpE</i>			-				-				-		

Pour la légende et les références, cf. Tableau 7.

Les deux derniers contextes concernent l'étude *in vitro* de l'effet de la température (37°C / 18°C) sur le transcriptome de deux souches de *L. garvieae* (Aguado-Urda et al., 2013): J = la souche 8831 provenant d'une lactococcose de truite ; K = la souche 21881 provenant d'une endocardite humaine.

III.2.2. Complexe protéolytique Clp

III.2.2.1. Protéines et rôle des protéines Clp

Chez les bactéries, le complexe protéolytique, proche structuralement du protéasome eucaryote (Hoskins et al., 2002, 2000; Kessel et al., 1995), est impliqué dans la dégradation des protéines mal repliées, un rôle crucial en condition de stress (Frees and Ingmer, 1999; Lemos and Burne, 2002; Nair et al., 2003; Robertson et al., 2002). Ce complexe est composé d'une protéase, ClpP, et d'ATPases de type Clp. Les ATPases Clp appartiennent à une famille très conservée dans les domaines du vivant, divisée en deux classes (Clarke, 1996; Frees et al., 2004; Schirmer et al., 1996) : les ATPases possédant deux sites de fixation de l'ATP (ClpA, ClpB, ClpC, ClpD, ClpE et ClpL) et celles n'en possédant qu'un (ClpX et ClpY). Plusieurs ATPases différentes peuvent être associées avec ClpP dans ce complexe protéolytique, notamment ClpA, ClpC, ClpE et ClpX mais ni ClpB ni ClpL (Alexopoulos et al., 2012; Dougan et al., 2002; Gottesman, 2003; Gottesman et al., 1993; Kim et al., 2001). Il a été observé que la localisation cellulaire (Kain et al., 2008) et les cibles du complexe protéolytique (Tableau 11) variaient selon sa composition en ATPases Clp

chez *B. subtilis*. Cependant, ces complexes protéolytiques peuvent dégrader des cibles variables selon les espèces bactériennes et les conditions (Frees et al., 2007).

Tableau 11. Protéines de *B. subtilis* identifiées comme ciblées par les divers complexes protéolytiques bactériens de type Clp, adapté de Frees et al. (2007).

Protéine ciblée	Rôle	Complexe protéolytique	Références
CtsR	régulateur	ClpCP	(Krüger et al., 2001)
SpollAB	régulateur	ClpCP	(Pan and Losick, 2003)
Sda	sporulation, répllication	ClpXP	(Ruvolo et al., 2006)
Spx	régulateur	ClpXP / ClpCP	(Nakano et al., 2003a, 2003b, 2002)
MurAA	synthèse du peptidoglycane	ClpCP	(Kock et al., 2004)
Protéines taguées ssrA	protéolyse	ClpXP	(Wiegert and Schumann, 2001)
ComK	régulateur (compétence)	ClpCP	(Turgay et al., 1998, 1997)
RsiW	régulateur	ClpXP et ClpEP	(Zellmeier et al., 2006)

Certaines voies de régulation ont pu être caractérisées chez les bactéries lactiques. Les complexes protéolytiques de *L. lactis* cibleraient spécifiquement CtsR, LexA et la protéine HdiR, une homologue fonctionnelle de LexA (Savijoki et al., 2003). Chez *Streptococcus pneumoniae*, l'absence du gène *clpP* affecte principalement le métabolisme énergétique et les protéines HSP (« Heat-Shock Proteins », protéines de réponse au stress thermique), dont une SOD et une POX (Q. Zhang et al., 2012).

Les cibles de la protéase ClpP ont été assez bien étudiées chez *S. aureus*. Via la formation des complexes protéolytiques, ClpP est capable de contrôler la concentration d'un large spectre de protéines dont des régulateurs globaux tels que CtsR, Spx, HrcA, PerR et CodY, mais aussi des protéines à l'importance physiologique capitale tels que RecA, FtsZ, GlmS et DnaK (Feng et al., 2013; Frees et al., 2014). En plus de ClpP, une autre protéase Clp est présente chez certains staphylocoques : ClpQ. Elle peut former un autre complexe protéolytique avec ClpY (Hsieh et al., 2011; Katayama et al., 1996; Missiakas et al., 1996).

III.2.2.2. Effet de l'interaction bactérienne, de l'aération, de la présence de H₂O₂ et de la température sur l'expression des protéases et ATPases Clp de bactéries lactiques et de *S. aureus*

Plusieurs études ont exploré l'effet de l'interaction bactérienne, de l'aération, de la présence de H₂O₂ et de la température sur l'expression des protéases et ATPases Clp de bactéries lactiques et de *S. aureus* (Tableau 12, résultats généraux en annexe 1). Le contexte de l'étude ainsi que la durée d'incubation jouent un rôle important sur les régulations de ces gènes, ce qui est cohérent avec leur rôle adaptatif discuté précédemment.

Tableau 12. Effet de l'interaction bactérienne, de l'aération, de la présence de H₂O₂ et de la température sur l'expression des protéases et ATPases Clp de *L. lactis*, *L. garvieae* et de *S. aureus*.

	Effet de l'interaction bactérienne			Effet de l'aération			Effet du H ₂ O ₂ sur <i>S. aureus</i>					Effet thermique sur <i>L. garvieae</i>	
	sur <i>S. aureus</i>		sur <i>L. lactis</i>	sur <i>S. aureus</i>		sur <i>L. lactis</i>							
Con- texte	A	B	A	D	E	C	F	G	H	I	E	J	K
<i>clpB</i>	-- / +						- / +			- / +	-	-	
<i>clpC</i>	--	++	-	-			- / +		+	--	+		
<i>clpE</i>			-									-	
<i>clpL</i>	-	-- / ++		-	-		-				- / +		
<i>clpP</i>				-	-		- / +		+	+	+		
<i>clpQ</i>	-	-											
<i>clpX</i>		-											
<i>clpY</i>	-												

Pour la légende et les références, cf. Tableau 10.

Dans le cas de *S. aureus*, un effet positif sur l'expression de *clpC* et *clpP* est observé suite à l'injection progressive de H₂O₂. Ceci suggère une activité du complexe protéolytique ClpCP augmentée et un effet potentiel sur les cibles de ClpCP, dont CtsR. Mais *clpC* et *clpP* sont également réprimés par l'aération. Ainsi, l'effet de la présence d'une bactérie lactique productrice de H₂O₂ en aération sur l'expression de ces gènes est encore indéterminé. ClpC étant associé avec ClpP dans un nombre important de régulations du stress oxydatif, l'effet de la présence de *L. lactis* sur son expression pourrait avoir un rôle crucial dans la modulation de la réponse au stress de *S. aureus* par *L. lactis*, c'est-à-dire dans les mécanismes d'inhibition. L'expression des gènes

clpY et *clpQ*, relatifs à autre complexe protéolytique, semble réprimée par *L. lactis*, spécialement *in vitro*, ce qui pourrait affecter les mécanismes de défense contre le stress de *S. aureus*.

Au niveau de la bactérie lactique antagoniste, la présence de *S. aureus* entraînerait une légère répression de deux ATPases, *clpC* et *clpE*. L'aération ne semble pas avoir d'effet. En revanche, la présence de peroxyde d'hydrogène a un effet sur plusieurs gènes *clp*, et notamment une surexpression de *clpC* et *clpP*.

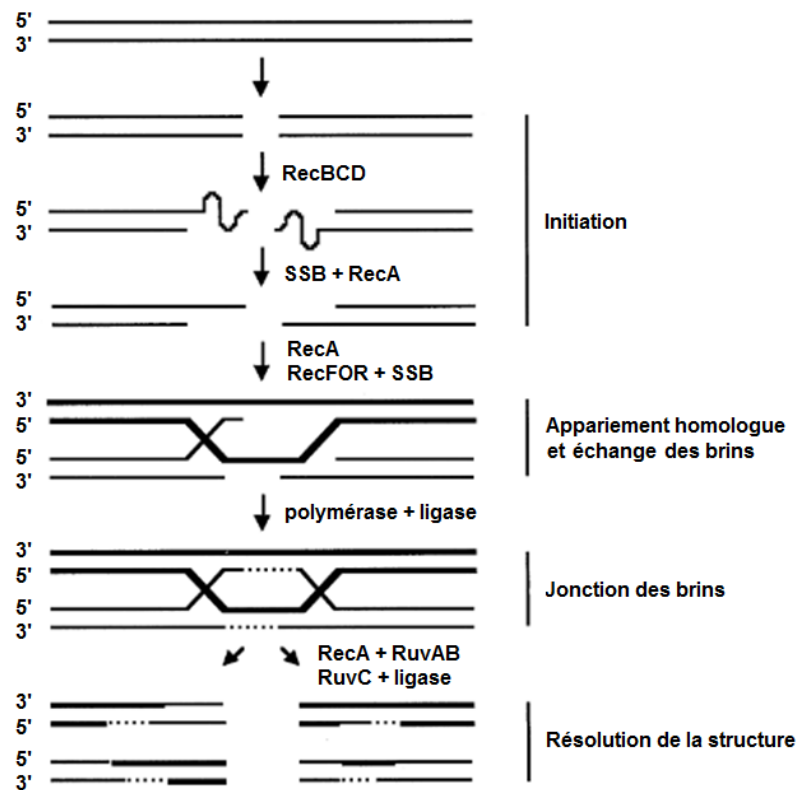
III.2.3. Réponse SOS

Les stress, par exemple le stress oxydatif dû à la présence de peroxyde d'hydrogène, peuvent entraîner des lésions importantes de l'ADN (Farr and Kogoma, 1991). Pour sa survie, la cellule bactérienne va alors devoir réparer ces lésions. La réponse SOS est un mécanisme d'action induit par ces phénomènes et permettant des réparations rapides de l'ADN. Bien que les gènes impliqués ou le mode de régulation soit spécifique à chaque organisme, les mécanismes de la réponse SOS sont relativement conservés dans tout le domaine bactérien (Erill et al., 2007). La réponse SOS fait intervenir différents effecteurs protéiques dont l'action est décrite figure 4.

Deux protéines sont généralement considérées comme les régulatrices clefs de cette réponse SOS : RecA, le régulateur positif, et LexA, le régulateur négatif. Ces régulateurs sont très conservés dans le domaine bactérien, bien que LexA soit absent chez certaines espèces (Eisen and Hanawalt, 1999; Kelley, 2006). Il a été suggéré que la réponse SOS serait tout de même fonctionnelle dans les bactéries ne possédant pas LexA. Elles utiliseraient alors d'autres régulateurs moins caractérisés comme par exemple HdiR, identifié chez certains lactocoques (Savijoki et al., 2003).

L'expression des gènes *recA* et *lexA* de *S. aureus*, ainsi que leurs protéines et régulons associés, est généralement induite par la présence de peroxyde d'hydrogène (Chang et al., 2006; Deng et al., 2014; Fuchs et al., 2013; Nagarajan and Elasri, 2007; Palazzolo-Ballance et al., 2008), suggérant que cette bactérie active la réponse SOS pour répondre aux dommages causés par le H₂O₂. De plus, la présence d'une bactérie lactique telle que *L. lactis* peut entraîner une répression des gènes *recA* et *lexA* de *S. aureus*, suggérant une modulation de la réponse SOS par l'interaction antagoniste (Cretenet et al., 2011; Even et al., 2009).

Figure 4. Modèle descriptif de réparation des lésions de l'ADN double-brin lors de la réponse SOS (tiré de McGrew and Knight, 2003).



III.2.4. Régulateurs de la réponse au stress

Chez les bactéries Gram +, plusieurs régulateurs de la réponse au stress existent. Six classes de HSP, chacune associée à un régulateur, ont été proposées concernant *B. subtilis* (Schumann, 2003). Chez les bactéries lactiques et les staphylocoques, ces régulateurs sont généralement conservés, et d'autres régulations peuvent exister.

III.2.4.1. Régulateur des gènes de classe I : HrcA

Dans le domaine bactérien, HrcA est un régulateur majeur de la réponse au stress car il réprime l'expression des opérons *groES-groEL* et *hrcA-grpE-dnaK-dnaJ* (Kuroda et al., 1999; Schumann, 2003; van de Guchte et al., 2002). Chez certaines bactéries lactiques, HrcA pourrait également contrôler l'expression de *clpP*, *clpE* ou *clpL*, mais cela ne semble pas être le cas des lactocoques (Chastanet and Msadek, 2003; Frees et al., 2007).

L'expression de la protéine HrcA est induite dans le cadre de divers stress, dont le stress oxydatif ou la présence de composés oxydants chez les staphylocoques comme chez les bactéries lactiques (Ricciardi et al., 2012; Wolf et al., 2008). L'activité de HrcA peut également être stimulée par la co-chaperonne GroEL au sein d'un complexe HrcA-GroEL (Liu et al., 2005; Mogk et al., 1997; Reischl et al., 2002; Wilson et al., 2005).

III.2.4.2. Régulateur des gènes de classe II : σ^B

La réponse de certaines bactéries aux stress est également régulée par des facteurs sigma alternatifs. En condition de stress, un facteur alternatif va remplacer le facteur de ménage σ^{70} au niveau des ARN polymérases et induire la transcription spécifique des gènes de réponse au stress. Les trois facteurs les mieux caractérisés dans le cadre de la réponse au stress chez les bactéries Gram⁺ sont σ^B , σ^H et σ^S (Hengge-Aronis, 2002; Rasouly and Ron, 2009; Schumann, 2003). Seul le facteur σ^B est exprimé par les staphylocoques et les bactéries lactiques, bien qu'il ne soit pas conservé dans toutes les espèces.

La classe des gènes de réponse au stress de classe II de *B. subtilis*, comprenant plus de 100 gènes (Price et al., 2001), est régulée par ce facteur σ^B , codé par *sigB* ou *rpoB*. Le facteur σ^B joue ainsi un rôle important dans la réponse à de multiples stress tels que la présence de H₂O₂, le stress thermique et les variations de pH (Cebrián et al., 2009). Le facteur σ^B de *B. subtilis* permet la transcription de *lexA* (Price et al., 2001), de deux catalases *katB* et *katX* (Engelmann et al., 1995; Petersohn et al., 1999; Price et al., 2001), d'un homologue de *osmC* (Price et al., 2001), de *clpP* et de *clpC* (Gerth et al., 1998; Krüger et al., 1996). Chez les staphylocoques, il régulerait aussi positivement l'expression de *clpL* (Frees et al., 2007).

III.2.4.3. Régulateur des gènes de classe III : CtsR

Chez les bactéries à Gram⁺, l'expression des HSP de classe III est sous le contrôle du régulateur transcriptionnel CtsR, qui réprime des gènes cibles en se fixant sur une séquence de nucléotides appelée CtsR-box (Derré et al., 1999). Le régulon CtsR est principalement composé des ATPases Clp et de la protéase ClpP (Schumann, 2003). De plus, *ctsR* est co-transcrit avec le gène *clpC*, appartenant au même opéron (Fiocco et al., 2010). Une spécificité des bactéries lactiques est que CtsR contrôle également la transcription de *groES* et *groEL*. L'opéron *ctsR-clpC* peut être induit

par le stress thermique et osmotique, mais aussi par d'autres types de stress chez ces bactéries (Bron et al., 2004; Fiocco et al., 2010; Lemos and Burne, 2002).

L'activité de CtsR est contrôlée par un complexe formé de McsA et McsB, codés à partir de l'opéron *ctsR-mcsA-mcsB-clpC* (Elsholz et al., 2011, 2010). Ce complexe régulerait négativement CtsR en condition de stress et positivement en absence de stress. Néanmoins, les gènes *mcsA* et *mcsB* ne sont pas conservés dans tout le domaine bactérien. Leur présence est variable chez les bactéries lactiques alors qu'ils sont généralement codés chez les staphylocoques. Dans les bactéries ne possédant pas ces gènes, l'activité de CtsR pourrait alors être médiée par des ATPases Clp telles que ClpE (Elsholz et al., 2010) ou ClpC (Kirstein et al., 2005; Krüger et al., 2001).

III.2.4.4. Autres régulateurs potentiels

D'autres régulateurs de la réponse au stress ont été identifiés chez les staphylocoques et les bactéries lactiques, mais dont le mode d'action est moins bien caractérisé.

La classe V des gènes de réponse au stress de *B. subtilis* ne comprend que deux gènes, inductibles par un stress thermique, osmotique ou oxydatif : *htrA* et *htrB* (Darmon et al., 2002; Schumann, 2003). Ces gènes sont positivement régulés par un TCS (« Two-Component System », système à deux composants) composé de CsrR (régulateur transcriptionnel) et CsrS (senseur histidine kinase). HtrA et HtrB sont des protéases « nettoyantes » de surface conservées dans tous les domaines du vivant (Pallen and Wren, 1997; Westers et al., 2006).

Le système de quorum-sensing LuxS a été largement étudié en raison de son influence sur la formation de biofilms et sur la virulence (Jimenez and Federle, 2014; Laverty et al., 2014). Mais en plus de cela, LuxS pourrait avoir un effet important sur la réponse au stress oxydatif et au pH, comme observé chez *S. mutans* (Wen and Burne, 2004). Il a ainsi été observé qu'une déplétion de *luxS* entraînait une surexpression de *dnaK* et *groEL*.

Chez les bactéries lactiques, une séquence de type « *ohrR*-box » (site de fixation de *ohrR* en amont de *ohrA* et impliqué dans sa répression) a été identifiée en amont du gène *poxB* de *Lactobacillus plantarum*. Ceci a permis de supposer que OhrR pourrait réprimer *poxB* sous certaines conditions (Lorquet et al., 2004). De plus, les régulateurs transcriptionnels SpxA1 et SpxA2 réguleraient positivement la transcription de *ahpC* chez les streptocoques (Chen et al., 2012; Kajfasz et al., 2015).

Chez les staphylocoques, le régulateur pléiotropique SarA régule directement ou indirectement l'expression de nombreux gènes (Reyes et al., 2011). Les gènes *sod*, ainsi que le gène codant pour la thiorédoxine réductase *trxB*, seraient contrôlés par SarA, soulignant son rôle potentiel dans la réponse au stress (Ballal and Manna, 2010, 2009).

III.2.4.5. Effet de l'interaction bactérienne, de l'aération, de la présence de H₂O₂ et de la température sur l'expression des régulateurs de la réponse au stress de bactéries lactiques et de *S. aureus*

Plusieurs études ont exploré l'effet de l'interaction bactérienne, de l'aération, de la présence de H₂O₂ et de la température sur l'expression des principaux régulateurs de la réponse au stress de bactéries lactiques et de *S. aureus* (Tableau 13, résultats généraux en annexe 1).

Tableau 13. Effet de l'interaction bactérienne, de l'aération, de la présence de H₂O₂ et de la température sur l'expression des gènes et protéines de *S. aureus*, *L. lactis* et *L. garvieae* impliqués dans la régulation de la réponse au stress.

	Effet de l'interaction bactérienne		Effet de l'aération		Effet du H ₂ O ₂ sur <i>S. aureus</i>						Effet thermique sur <i>L. garvieae</i>		
	sur <i>S. aureus</i>	sur <i>L. lactis</i>	sur <i>S. aureus</i>	sur <i>L. lactis</i>									
Con- texte	A	B	A	D	E	C	F	G	H	I	E	J	K
<i>hrcA</i>							-				-		
<i>rpoB</i>							-				-		
<i>ctsR</i>	- - -	+ +	-				- / +		+		- / +		

Pour la légende et les références, cf. Tableau 10.

Excepté une légère répression de *ctsR* en présence de *S. aureus*, l'expression des régulateurs de réponse au stress de *L. lactis* est peu affectée. De la même façon, l'expression de ces gènes est peu ou pas affectée par le stress thermique chez *L. garvieae*.

Au niveau de *S. aureus*, l'expression de *ctsR* suit les mêmes variations que celles observées pour *clpC* : fortement réprimée *in vitro* et fortement surexprimée en matrice fromagère par la présence de *L. lactis*. En absence de stress, *clpC* est normalement réprimé par CtsR (Krüger and Hecker, 1998). Le fait que l'expression de *clpC* suive les mêmes variations que celles de *ctsR* suggère donc que cette inhibition est levée en présence de *L. lactis* ou que d'autres mécanismes sont mis

en jeu. Ceci pourrait révéler un stress de *S. aureus* en présence de son antagoniste, et le rôle de CtsR dans le mécanisme d'inhibition mériterait alors d'être clarifié. En parallèle, l'expression de ces régulateurs est modifiée de manière variable par la présence de H₂O₂, suggérant une réponse complexe à ce stress. Néanmoins, l'expression de *hrcA* et *rpoB* serait plutôt réprimée tandis que celle de *ctsR* pourrait être réprimée, surexprimée ou stable selon les contextes.

III.3. Autres mécanismes potentiellement impliqués dans l'inhibition de *S. aureus*

III.3.1. Compétition nutritionnelle

La compétition nutritionnelle jouerait un rôle crucial dans l'inhibition de *S. aureus* par *L. lactis* (Charlier et al., 2008). Un rôle de la compétition nutritionnelle, notamment pour la thréonine, concernant l'antagonisme de *L. garvieae* contre la croissance de *S. aureus* en matrice laitière n'a pas pu être définitivement écarté. L'expression du principal régulateur de l'adaptation aux carences nutritionnelles, CodY (Majerczyk et al., 2008; Sonenshein, 2005), est affectée par la présence de *L. lactis*. Or, la sensibilité de *S. aureus* à une carence en thréonine est dépendante de CodY (Pohl et al., 2009). De plus, le régulon de CodY est globalement réprimé par la présence de H₂O₂ (Fuchs et al., 2013), suggérant que la présence de H₂O₂ peut moduler l'adaptation nutritionnelle de *S. aureus* au milieu. L'effet d'une compétition nutritionnelle sur *S. aureus*, particulièrement pour la thréonine, et le rôle de CodY restent à éclaircir.

III.3.2. Homéostasie en métaux

Certaines protéines impliquées dans le stress oxydatif sont des métalloprotéines. Elles nécessitent des ions métalliques pour leur activité enzymatique, comme par exemple la SOD ou les enzymes de l'ETC. De ce fait, l'homéostasie en métaux dans la cellule est un processus crucial en lien avec le stress oxydatif et les mécanismes de biopréservation. De plus, la présence de métaux et ions métalliques peut avoir un effet inhibiteur de la croissance *S. aureus* à partir de certaines concentrations (Chudobova et al., 2015; Doyle et al., 1975).

Le transport et l'internalisation des métaux visant à assurer l'homéostasie en métaux dans la cellule, sont médiés par des protéines spécifiques conservées dans le domaine bactérien (Moore

and Helmann, 2005). Les loci de gènes assurant ces fonctions sont sous le contrôle de régulateurs spécifiques à chaque métal et donc à chaque type de transport (Lee and Helmann, 2007). Les principaux régulateurs sont Fur pour le fer (Bsat and Helmann, 1999; Mills and Marletta, 2005), Zur pour le zinc (Gaballa and Helmann, 1998; Outten and O'Halloran, 2001), Mur, nommé parfois MntR, pour le Manganèse (Díaz-Mireles et al., 2005; Platero et al., 2007) et Nur, parfois nommé NikR, pour le Nickel (Ahn et al., 2006), pour « Ferric / Zinc / Manganese / Nickel uptake regulator ». Ils appartiennent à la même famille de métalloprotéines. Le mode de régulation et les cibles de ces régulateurs dépendent donc de la composition en métal de leur noyau, variable selon l'homéostasie en métaux dans la cellule.

La métalloprotéine PerR est une homologue structurale aux protéines Fur / Zur / Mur / Nur. Son activité est modulée par l'homéostasie en fer, zinc et manganèse (Faulkner et al., 2012; Horsburgh et al., 2001a) mais aussi par la présence de peroxydes, dont le H₂O₂, qui catalysent l'oxydation de son noyau (King et al., 2000; Lee and Helmann, 2006). PerR agit comme un répresseur transcriptionnel de gènes de réponse au stress oxydatif comme la catalase KatA, la thiorédoxine réductase TrxB et les peroxyrédoxines AhpCF (Chen et al., 1995; Fuangthong et al., 2002; Handley et al., 2015; Horsburgh et al., 2001a; Rea et al., 2005) mais aussi de gènes impliqués dans l'homéostasie en métaux tels que les gènes de synthèse de l'hème (Chen et al., 1995; Rea et al., 2005), et les régulateurs PerR / Fur eux-mêmes (Fuangthong et al., 2002).

Si ces métalloprotéines régulatrices ont été identifiées et décrites chez certaines bactéries lactiques, elles ne sont généralement pas présentes chez les lactocoques.

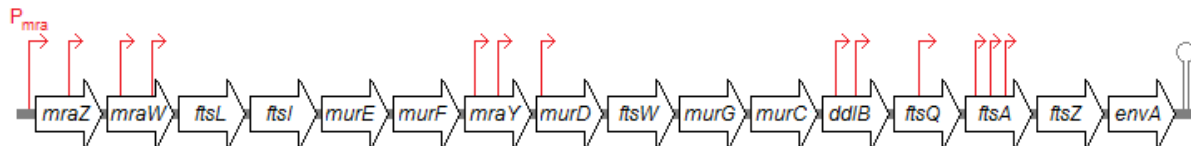
En revanche, *perR*, *fur* et plusieurs gènes des régulons associés sont surexprimés en présence de H₂O₂ (Palazzolo-Ballance et al., 2008; Fuchs et al., 2013). De ce fait, l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans l'homéostasie du fer serait modulée par la présence de H₂O₂. Etant donné que PerR / Fur active l'expression de plusieurs gènes de réponse au stress oxydatif et à la présence de H₂O₂ mais aussi des enzymes qu'ils codent, la surexpression de *perR* et *fur* suggère un mode de défense de *S. aureus* contre le H₂O₂ via l'homéostasie des métaux.

III.3.3. Division cellulaire de *S. aureus*

Une inhibition de croissance peut faire intervenir un mode d'action bactéricide en provoquant la mort cellulaire, ou bactériostatique en provoquant plutôt le blocage ou ralentissement de la

division cellulaire. La division cellulaire bactérienne fait intervenir plusieurs protéines formant un ensemble de réactions et complexes appelé « divisome ». Le divisome a été bien caractérisé chez *E. coli* (pour revue, Egan and Vollmer, 2013). Il fait intervenir un anneau formé de protéines FtsZ (« Z-ring ») et d'autres protéines impliquées dans diverses fonctions de division cellulaire. Parmi ces protéines, certaines sont essentielles au mécanisme de division cellulaire (toutes les protéines de type Fts et ZipA) et donc généralement à la survie de la bactérie. Récemment, il a été suggéré que certains gènes de division cellulaire seraient sous le contrôle du régulateur transcriptionnel MraZ (Eraso et al., 2014).

Figure 5. Organisation du cluster *dcw* chez *E. coli* (d'après les travaux de Ayala et al., 1994; Boyle et al., 1997; Hara et al., 1997; Mingorance et al., 2004; Vicente et al., 1998).



Les promoteurs supplémentaires (supposés ou vérifiés) en plus du premier promoteur, P_{mra} , sont indiqués par des flèches rouges. D'autres promoteurs pourraient exister.

Plusieurs de ces protéines sont codées au sein d'un cluster essentiel, le cluster « *dcw* » (pour « *d*ivision *c*ell *w*all »), également appelé cluster « *mra* » du fait des premiers gènes transcrits, *mraW* et *mraZ* (Figure 5). Ce cluster est conservé dans le domaine bactérien, même si son organisation et les gènes impliqués peuvent varier (Vicente et al., 1998). Chez *S. aureus*, le cluster *dcw* est identique à celui de *E. coli* décrit figure 5. Les neuf premiers gènes sont co-transcrits (Hara et al., 1997). De plus, P_{mra} participerait également à l'expression de *ddlB* et *ftsZ* (Mengin-Lecreulx et al., 1998), suggérant une co-transcription minoritaire mais notable de tous les gènes du cluster *via* P_{mra} . Récemment, il a été proposé que MraZ serait un régulateur transcriptionnel réprimant le promoteur P_{mra} et ainsi potentiellement le niveau de transcription de nombreux gènes du cluster *dcw* (Eraso et al., 2014). MraZ réprimerait également l'expression de gènes extérieurs au cluster *dcw*. Le gène *mraW* coderait pour une méthyltransférase de l'ARNr 16S (Carrión et al., 1999; Kimura and Suzuki, 2010) dont le lien avec la division cellulaire reste encore à éclaircir.

Ainsi, la régulation de l'expression de ces gènes par la présence de bactéries lactiques pourrait contribuer à des processus d'inhibition, en bloquant la division cellulaire. De manière cohérente, il a été observé que certains gènes impliqués dans la division cellulaire de *S. aureus* (dont *ftsZ*, *ftsL* et *ftsH*) étaient réprimés par la présence de *L. lactis* en fromage et en biofermenteur (Cretenet et al., 2011; Even et al., 2009).

III.3.4. Bactériocines

Quatre types de bactériocines produites par *L. garvieae* ont été identifiés, comme décrit précédemment (Borrero et al., 2011; Maldonado-Barragán et al., 2013; Tosukhowong et al., 2012; Villani et al., 2001). Trois d'entre elles n'ont montré aucune capacité inhibitrice de souches de *S. aureus*, la quatrième n'a pas été testée. Cependant, peu de souches de *L. garvieae* ont pour l'instant été caractérisées sur un plan génomique et génétique. D'autres bactériocines pourraient ainsi être identifiées. De plus, l'effet inhibiteur d'une bactériocine contre différentes souches d'une même espèce bactérienne peut être variable. Par exemple, la garvieacine Q peut entraîner des inhibitions de croissance variables d'un facteur 100 selon la souche de *L. garvieae* ciblée (Tosukhowong et al., 2012). Étonnamment, cet effet semble dépendant de l'origine géographique. En effet, la garvieacine Q isolée d'une souche thaïlandaise de *L. garvieae* peut inhiber, parfois fortement, des souches d'*Enterococcus faecium*, de *Listeria ivanovii* et de *Pediococcus pentosaceus* d'origine thaïlandaise alors qu'elle n'inhibe pas les souches de mêmes espèces d'autres origines géographiques (Tosukhowong et al., 2012). L'effet de la garvieacine Q a été testé uniquement sur une souche de *S. aureus* d'origine américaine. Ainsi, il est nécessaire d'analyser le potentiel inhibiteur des garvieacines identifiées dans les souches de *L. garvieae* en relation avec la biopréservation.

III.3.5. Localisation de l'effecteur

Aucun effet inhibiteur du surnageant de co-culture de *L. garvieae* et *S. aureus* sur la croissance de *S. aureus* n'a été observé (Alomar et al., 2008b). Il a ainsi été supposé que les composés inhibiteurs n'étaient pas extracellulaires. Les surnageants provenant de cultures préalablement conservées à 4°C, il a été proposé que le composé inhibiteur pouvait également être extracellulaire, mais instable dans le milieu TS (Trypticase Soja) et donc dégradé durant le

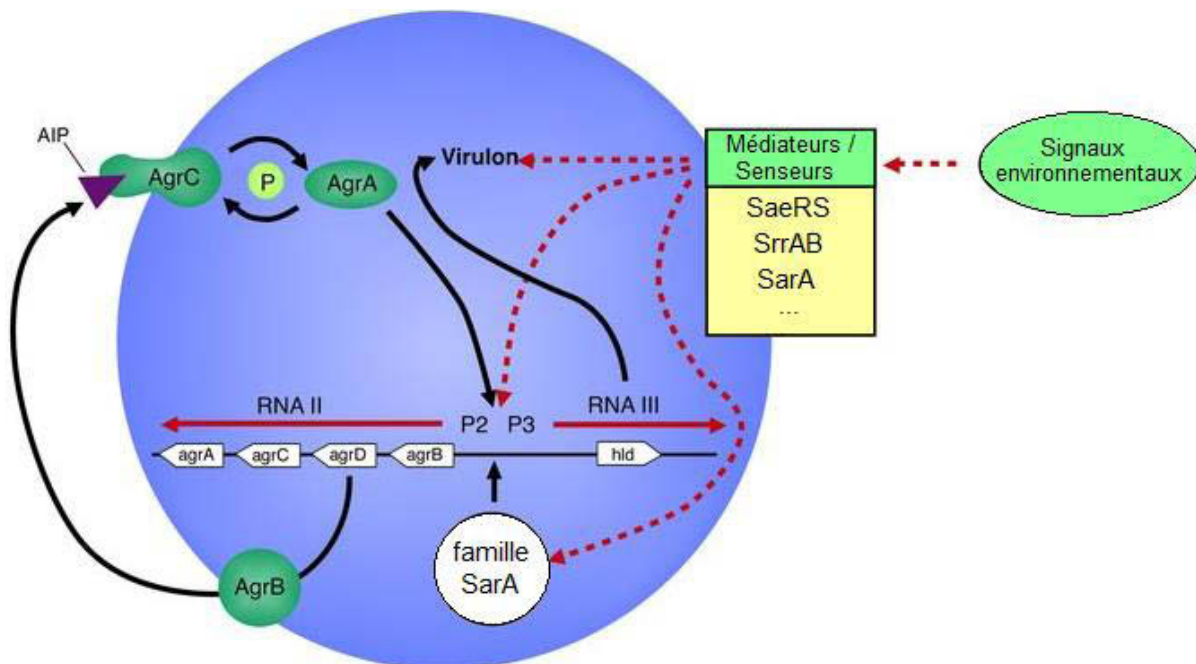
stockage. Cette hypothèse correspondant au profil du peroxyde d'hydrogène, cela expliquait donc l'absence d'effet inhibiteur de ces surnageants.

Ces résultats suggèrent que le ou les effecteurs potentiels supplémentaires au H_2O_2 , ne seraient pas extracellulaires ou seraient instables. Néanmoins, ils ont été obtenus dans des conditions spécifiques : sur des cultures de nuit de *S. aureus* sous faible oxygénation arrêtées à 6 h et 24 h. Le ou les effecteurs recherchés pourraient être produits et/ou actifs dans d'autres conditions. De plus, ces effecteurs ayant probablement un effet inhibiteur relativement faible comparé à celui du H_2O_2 , il est possible que l'expérience réalisée (well-diffusion agar test) n'ait pas permis d'observer leur potentiel inhibiteur.

III.4. Régulation de la virulence de *S. aureus*

La virulence de *S. aureus* est sous le contrôle principal d'un système auto-inductible appelé « système *agr* » composé de 4 protéines AgrA, AgrB, AgrC et AgrD, et deux ARN non-codants, RNAII et RNAIII, dont l'expression est contrôlée par AgrA (Figure 6).

Figure 6. Régulation des gènes de virulence (virulon) de *S. aureus* (adapté de Yarwood and Schlievert, 2003)



Le locus *agr* est co-transcrit au sein d'un ARN nommé RNAII qui code pour quatre protéines. Le gène *agrD* code pour un peptide signal AIP (Auto-Induced Peptide) qui va être excrété *via* le transporteur AgrB. Le signal va alors être capté par le senseur AgrC qui va le transmettre au régulateur transcriptionnel AgrA. AgrA va alors pouvoir activer deux promoteurs : celui du locus *agr*, conditionnant alors une boucle auto-catalytique amenant à sa propre expression, et celui de *hld* / RNAIII. RNAIII est un ARN non-codant qui peut réguler à un niveau post-transcriptionnel l'expression de nombreux gènes de virulence (Abdelnour et al., 1993; Janzon and Arvidson, 1990). Il régule également directement l'expression de la delta-hémolysine *hld* puisque son ARNm est transcrit dans RNAIII. Le régulateur AgrA régulerait de nombreux gènes de réponse au stress (Dassy et al., 1993; Gaskill and Khan, 1988) bien que la plupart de ces régulations puisse être causées indirectement par la régulation de RNAIII. En effet, l'expression des gènes de virulence est modifiée de façon similaire dans le cas d'un mutant Δ *agrA* et dans celui d'un mutant Δ *hld* (Janzon and Arvidson, 1990). Le système *agr* est sous le contrôle de certains signaux environnementaux comme le pH ou la concentration en glucose (Regassa et al., 1992; Regassa and Betley, 1992). Il a également été observé que ce système était exprimé de plus en plus fortement lors de la croissance de *S. aureus*, bien que cet effet soit dépendant des souches (Cretenet et al., 2011; Even et al., 2009; Rogasch et al., 2006).

Le système *agr* est également sous le contrôle de plusieurs médiateurs moléculaires, et parmi les principaux SaeRS, SrrAB et la « famille » SarA.

SaeRS est un TCS (SaeS est le senseur, SaeR le régulateur) qui répond à plusieurs stress environnementaux (Novick and Jiang, 2003) mais l'effet du peroxyde d'hydrogène est encore mal connu. En effet, alors que la présence de H₂O₂ peut induire l'expression des gènes *saeR* et *saeS* (Palazzolo-Ballance et al., 2008), le régulon de SaeRS ne semble pas être affecté en présence de H₂O₂ (Fuchs et al., 2013). SaeS contrôlerait l'expression de *agrA*, mais le mode d'action reste également à éclaircir. En effet, il a été montré que SaeS pouvait inhiber la transcription de *agrA* dans certaines conditions (Liang et al., 2006), mais n'avoir aucun effet sur son expression dans d'autres (Novick and Jiang, 2003; Rogasch et al., 2006). SaeS contrôle également l'expression de nombreux gènes de virulence (Giraud et al., 1996; Goerke et al., 2005; Rogasch et al., 2006; Steinhuber et al., 2003).

SrrAB est un autre TCS (SrrB est le senseur, SrrA le régulateur), activé en anaérobiose (Fuchs et al., 2007) et permettant l'adaptation de la cellule à l'anaérobiose (Pragman et al., 2007a, 2007b;

Throup et al., 2001). Il serait également impliqué dans la réponse au H₂O₂, l'expression du gène *srrA*, tout comme de la protéine SrrB, étant réprimée en présence de peroxyde d'hydrogène (Chang et al., 2006). Il contrôlerait également certains gènes de virulence (Ulrich et al., 2007). En absence d'aération, SrrA peut réprimer l'expression de *agrA* et *hld* / RNAlII (Pragman et al., 2004; Yarwood et al., 2001).

Les régulateurs de la famille SarA sont également impliqués dans la régulation de la virulence et sont contrôlés par divers signaux environnementaux dont le peroxyde d'hydrogène qui peut réprimer l'expression de *sarA* (Palazzolo-Ballance et al., 2008). Cette famille est constituée d'au moins treize protéines différentes aux rôles plus ou moins bien caractérisés (Cheung et al., 2008). SarA, SarB et SarC correspondent à la même région génétique mais transcrite par trois promoteurs différents (Bayer et al., 1996). Parmi ces régulateurs, il a été noté que SarA, SarR et SarU pouvaient induire l'expression de *agrA* (Cheung et al., 2004) et SarX pouvait la réprimer (Manna and Cheung, 2006).

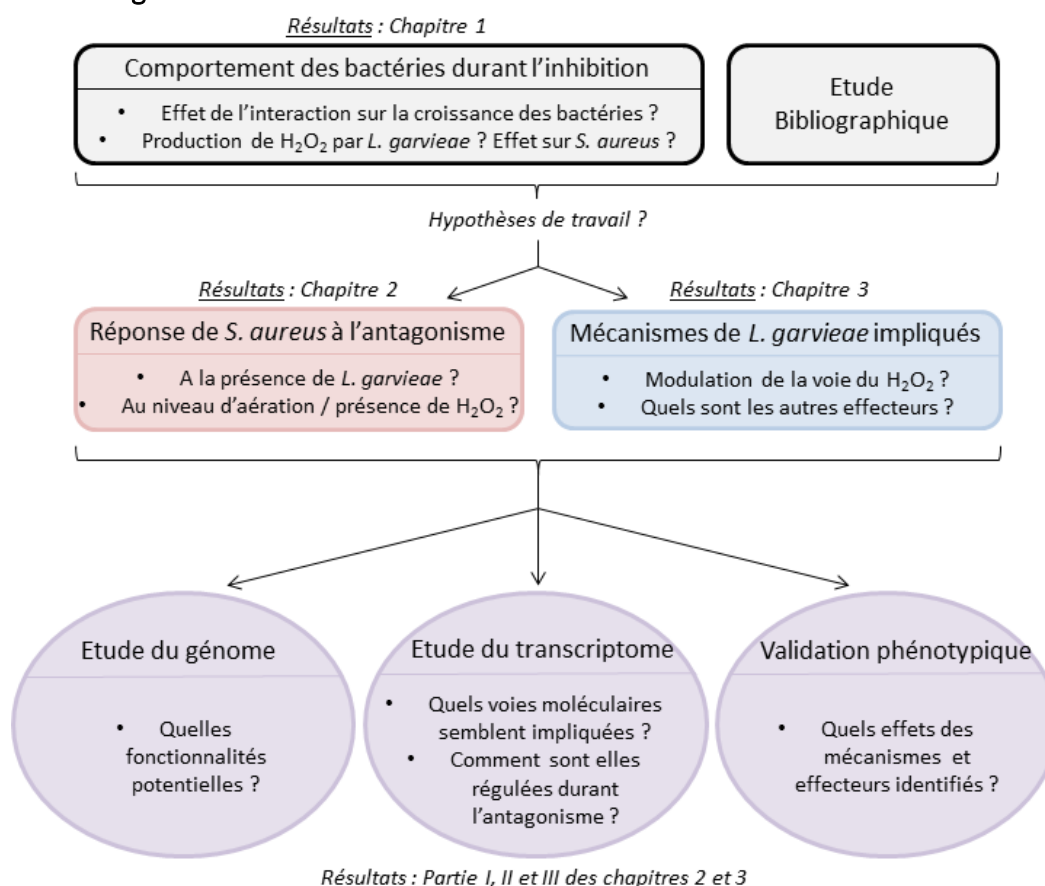
D'autres régulateurs sont impliqués dans le contrôle du système *agr* et des gènes de virulence, comme le régulateur pléiotropique CodY, le système ArlSR ou le facteur σ^B (Cheung et al., 2008; Fournier et al., 2001; Majerczyk et al., 2008; Yarwood and Schlievert, 2003), mais leur rôle semble moins important et moins caractérisé.

La présence de *L. lactis* peut modifier l'expression de divers gènes de virulence de *S. aureus*. Elle provoque une répression des gènes codant pour les entérotoxines et du système *agr* en biofermenteur (Even et al., 2009). En fromage, le système *agr* est également fortement réprimé par la présence de *L. lactis*, mais l'expression des gènes codant pour les entérotoxines est plus variable, suggérant l'implication d'autres régulateurs (Cretenet et al., 2011). Le gène *saeR* est également réprimé. Ainsi, la compréhension des mécanismes de régulation des gènes de virulence de *S. aureus* durant son inhibition provoquée par *L. garvieae* est cruciale.

IV. Conclusion de l'étude bibliographique et stratégie choisie pour l'étude de l'antagonisme de *L. garvieae* vis-à-vis de *S. aureus*

Dans le cadre de l'étude des processus de biopréservation, la caractérisation des antagonismes microbiens et des mécanismes sous-jacents est d'une importance cruciale pour optimiser l'utilisation des micro-organismes protecteurs, mais aussi pour prévenir et contrôler les risques. L'antagonisme de *L. garvieae* vis-à-vis de *S. aureus* est un modèle d'étude original et pertinent, étant donné le mode d'action mis en jeu, l'ubiquité, le potentiel biotechnologique, la probable innocuité de *L. garvieae* dans les produits laitiers et l'enjeu sanitaire important que représente le contrôle de la croissance de *S. aureus*. Un acteur de cet antagonisme a été identifié : le peroxyde d'hydrogène. Cependant, l'ensemble des mécanismes entraînant l'antagonisme de *L. garvieae* vis-à-vis de *S. aureus* est encore mal défini. Dans l'objectif de mieux caractériser ces mécanismes, ce travail de thèse a été entrepris avec la stratégie exposée en Figure 7.

Figure 7. Stratégie utilisée lors de ce travail de thèse.



Dans un premier temps, le comportement physiologique (croissance, production de H₂O₂) **de *L. garvieae* et *S. aureus* durant l'antagonisme a été déterminé** et mis en relation avec les données de l'étude bibliographique afin de proposer des hypothèses de travail. **Dans un deuxième temps, la réponse de *S. aureus* à cet antagonisme a été également caractérisée.** **Dans un troisième temps, les mécanismes entraînant l'antagonisme de *L. garvieae* vis-à-vis de *S. aureus* ont été identifiés.** Pour ces deux derniers points, trois approches complémentaires ont été entreprises dans ce travail de thèse.

Premièrement, **une approche génomique** a permis de déterminer si les principaux acteurs moléculaires potentiellement mis en jeu (Tableau 14), identifiées par l'étude bibliographique, sont présents dans le génome des espèces d'intérêt.

Deuxièmement, **une approche transcriptomique** visait à identifier comment certaines voies génétiques d'intérêt sont exprimées et régulées durant l'antagonisme. Afin de mieux caractériser la voie du H₂O₂ et d'identifier d'autres effecteurs de l'inhibition, les effets des deux paramètres modulant principalement l'inhibition, l'aération et la présence de l'autre bactérie, ont été explorés pour chacune des bactéries. **Concernant *S. aureus*,** ces effets avaient déjà été étudiés (mais l'effet de *L. garvieae* devait être exploré), amenant plusieurs hypothèses de travail. L'expression des gènes impliqués dans les principaux mécanismes moléculaires potentiellement mis en jeu, identifiés lors de l'Etude Bibliographique (réponse au H₂O₂, réponse au stress, division cellulaire, virulence, cf. Tableau 14) a donc été évaluée lors de l'inhibition provoquée par *L. garvieae* par **une approche transcriptomique ciblée.** **Concernant *L. garvieae*,** les effets de l'aération, de la présence de *S. aureus* et du H₂O₂ sont pour l'instant totalement inconnus. De plus, l'inhibition de *S. aureus* serait également liée à des effecteurs de *L. garvieae* autres que le H₂O₂, également inconnus. Pour répondre à ces problématiques, nous avons privilégié une caractérisation du génome couplée à **une approche transcriptomique globale.** Pour cette dernière, la technique du RNA sequencing (« RNA-seq ») a été choisie pour sa rapidité et sa fiabilité par rapport aux techniques d'hybridation sur puce (Pinto et al., 2011).

Troisièmement, les hypothèses découlant des résultats obtenus grâce à ces approches ont été vérifiées par **une approche phénotypique,** afin de déterminer le lien entre ces régulations génétiques et l'inhibition de *S. aureus*.

Tableau 14. Gènes dont la présence (« génome ») et l'expression (« transcriptome ») doivent être évaluée chez *L. garvieae* et *S. aureus*.

Voie métabolique	Description	Génome ^a		Transcriptome ^a	
		<i>L. garvieae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. garvieae</i>	<i>S. aureus</i>
Synthèse du H ₂ O ₂	POX	<i>pox</i>	<i>cidC</i>	APPROCHE GLOBALE	
	SOD	<i>sodA</i>	<i>sodA, sodM</i>		<i>sodA</i>
Dégradation du H ₂ O ₂	catalase (KatA)		<i>katA</i>		<i>katA</i>
	peroxyrédoxine	<i>ahpC, ahpF</i>			<i>ahpC</i> ou <i>ahpF</i>
	systèmes antioxydants	<i>trxA, trxB, grx, gshR</i>			
	glutathion peroxydase	<i>gpx / gpo</i>			
Dégradation des autres peroxydes		<i>osmC, ohrA, ohrR</i>			
Consommation du O ₂	NADH oxydase NoxE	<i>noxE</i>			
	NADH déshydrogénases	<i>noxA, noxB</i>			
	autres	<i>lox / lctO</i>			
Régulateurs de la réponse au stress		<i>hrcA, ctsR, rpoB</i>			<i>ctsR</i>
Chaperonnes	complexe GroESL	<i>groES, groEL</i>			
	système DnaK	<i>dnaK, dnaJ, grpE</i>			<i>dnaK</i>
	chaperonnes de l'ARN	<i>hfq, ybeY</i>			
ATPases et protéases de type Clp		<i>clpB, clpC, clpD, clpE, clpL, clpP, clpQ, clpY, clpX</i>			<i>clpC</i> ou <i>clpP</i>
Régulateurs de la réponse SOS		<i>recA, lexA</i>			
Virulence et régulations globales (<i>S. aureus</i>)	système Agr		<i>agrA, agrB, agrC, agrD, hld / RNAIII</i>		<i>agrA / RNAII, hld / RNAIII</i>
	TCS SaeRS		<i>saeR, saeS</i>		<i>saeR</i> ou <i>saeS</i>
	TCS SrrAB		<i>srrA, srrB</i>		<i>srrA</i> ou <i>srrB</i>
	CodY		<i>codY</i>		<i>codY</i>
Virulence (<i>L. garvieae</i>)	gènes de la capsule	15 gènes ^b			
	hémolysines	3 gènes ^b			
Division cellulaire / cluster <i>dcw</i>			<i>mraZ, mraW</i>		<i>mraZ, mraW</i>
Homéostasie des métaux			<i>perR, fur</i>		

^a les cases grisées correspondent à des gènes dont l'étude a été jugée peu pertinente compte tenu de l'étude bibliographique.

^b selon Morita et al. (2011) et Miyauchi et al. (2012).

METHODOLOGIE

La méthodologie relative aux résultats décrits dans les publications est disponible dans la section « Materials and Methods » des articles concernés issus de ce travail de thèse. Les paragraphes suivants détaillent plutôt la méthodologie relative aux résultats peu ou pas décrits dans ces publications, concernant :

- I) les paramètres généraux (description, choix),
- II) le suivi de l'évolution de la croissance des souches bactériennes et de la concentration en peroxyde d'hydrogène au cours du temps (méthodologie relative à tous les chapitres de résultat, et surtout le chapitre 1),
- III) la détermination de la réponse de *S. aureus* à son inhibition provoqué par *L. garvieae* (méthodologie relative au chapitre 2 des résultats),
- IV) la détermination des mécanismes de *L. garvieae* impliqués dans l'antagonisme vis-à-vis de *S. aureus* (méthodologie relative au chapitre 3 des résultats).

I. Paramètres généraux des expérimentations en culture

Les paramètres généraux sont résumés dans le tableau 15 et détaillés dans les paragraphes suivants. Sauf contre-indication, les cultures ont toutes été réalisées dans ces conditions.

Tableau 15. Paramètres et conditions de culture utilisés lors de ces travaux de thèse.

Paramètre / Condition	Détails
Souches bactériennes <i>L. garvieae</i> N201 <i>S. aureus</i> SA15 <i>S. aureus</i> MW2	isolée de fromage de Saint-Nectaire (Alomar, 2007) isolée de lait cru (Alomar, 2007) isolée d'infections humaines
Milieu BHI	bouillon Brain-Heart Infusion (Biokar Diagnostic, Pantin, France)
Température 30°C	incubation dans un Infors HT Minitron (Infors AG, Bottmingen, Suisse)
Temps d'incubation 0 h, 3 h, 6 h, 9 h, 24 h	
Inoculations <i>S. aureus</i> SA15 / MW2 <i>L. garvieae</i> N201	10 ⁶ cellules / mL 10 ⁷ cellules / mL
Volume de culture 50 mL	tubes de 50 mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), sans agitation erlenmeyers de 250 mL, agitation orbitale à 250 rpm
Niveau d'aération Faible Elevé	

I.1. Souches et génomes disponibles

Les expériences ont été réalisées sur une souche de *L. garvieae*, la souche N201 isolée de fromage de Saint-Nectaire (Alomar, 2007), et deux souches de *S. aureus*, la souche SA15 isolée de lait cru (Alomar, 2007) et la souche MW2 isolée d'infections humaines et fournie par S. Even (UMR1253 STLO, INRA).

Le génome de la souche *L. garvieae* N201 a été séquencé par une approche métagénomique (cf. IV.1.1). Le génome de la souche *S. aureus* MW2 est disponible sous le numéro RefSeq NC_003923.1. Le génome de la souche *S. aureus* SA15 a été séquencé au cours de ce travail de thèse (cf. III.1.1.) mais les données issues du séquençage de *S. aureus* SA15 n'ont pas encore été soumises aux bases de données du NCBI.

I.2. Bouillons de culture et milieux solides utilisés

La préparation des milieux utilisés lors de ce travail de thèse a été réalisée selon les spécifications des fabricants et est détaillée en annexe 2.

I.3. Précultures

Avant chaque expérience, des précultures ont été préparées selon le mode opératoire suivant. A partir de cryotubes de *L. garvieae* N201, *S. aureus* SA15 et *S. aureus* MW2 stockées à -80°C, des cultures de 10 mL ont été inoculés en bouillon M17 (*L. garvieae*) ou BHI (*S. aureus*). Ces cultures ont été incubées ~ 20 h à 30°C (*L. garvieae*) ou à 37°C (*S. aureus*) puis étalées respectivement en milieu solide BHI ou BP. Des colonies isolées de chaque souche bactériennes ont été prélevées et ont été ensemencées dans 10 mL de bouillon M17 (*L. garvieae*) ou BHI (*S. aureus*). Ces cultures ont été incubées ~ 20 h à 30°C (*L. garvieae*) ou à 37°C (*S. aureus*). Chaque culture a ensuite servi à inoculer 80 mL bouillon BHI à hauteur de 10%. Ces cultures ont été incubées ~ 20 h à 30°C (*L. garvieae*) ou à 37°C (*S. aureus*). La concentration cellulaire de ces cultures a été déterminée avec une cellule de Petroff-Hauser. Ces précultures ont été utilisées pour les inoculations nécessaires aux cultures bactériennes des expériences réalisées.

I.4. Choix des paramètres

Nous avons choisi d'étudier l'antagonisme de *L. garvieae* contre la croissance de *S. aureus* essentiellement *in vitro*, en milieu BHI, pour plusieurs raisons :

- éviter des effets liés à la complexité d'une matrice alimentaire pour mieux cibler directement l'étude de l'interaction entre les deux bactéries,
- le BHI est un milieu riche non-limitant pour la croissance des bactéries,
- le H₂O₂ y joue un rôle important dans l'inhibition (Delbes-Paus et al., 2010),
- les paramètres modulant l'inhibition ont été caractérisés dans ce milieu (Alomar et al., 2008a, 2008b).

Nous avons également tamponné le milieu à pH = 7, dans le but de s'affranchir du phénomène d'acidification dont le rôle dans l'inhibition semble mineur (Alomar et al., 2008b). Le choix d'incuber les cultures à 30°C durant 24 h et d'inoculer *L. garvieae* N201 à 10⁷ UFC.mL⁻¹ avait pour but d'utiliser des paramètres proches d'étapes de fabrication fromagère, tout en garantissant une inhibition de *S. aureus* par *L. garvieae* assez forte pour être exploitée (Alomar et al., 2008a). L'inoculation de *S. aureus* à 10⁶ UFC.mL⁻¹ avait pour but de conserver, malgré l'inhibition par *L. garvieae*, une population suffisante de *S. aureus* (Alomar et al., 2008a) pour permettre l'exploration des mécanismes de réponse de *S. aureus*.

II. Suivi de l'évolution de la croissance de *S. aureus* et *L. garvieae* et de la concentration en peroxyde d'hydrogène au cours du temps

Méthodologie relative aux résultats du chapitre 1, 2 et 3

La méthodologie complète expliquant ces suivis est décrite dans les paragraphes de « Materials and Methods » des articles :

- Article n°1 : Delpech et al., Food Microbiology, 2015 (disponible à la suite du chapitre 2)
- Article n°3 : Delpech et al. en cours de soumission (disponible à la suite du chapitre 3)

Les paragraphes suivants précisent la méthodologie utilisée pour réaliser le suivi de la croissance des souches bactériennes et la mesure de la concentration en H₂O₂ à partir de chaque culture.

II.1. Suivi de croissance des souches bactériennes

A la fin des durées d'incubation, 10 mL de chaque culture ont été prélevés et malaxés dans un « stomacher » de laboratoire MiniMix[®] 100 W CC[®] (Interscience, Saint Nom la Bretèche, France) à 12 coups.sec⁻¹ durant 4 min, afin de séparer les agrégats cellulaires. Une série de dilutions au 1/10^e a été réalisée dans du liquide de Ringer (VWR Chemicals, VWR International, Radnor, Pennsylvanie, USA). Ensuite, 100 µL de chaque dilution ont été étalés au râteau sur boîte de Pétri dans un milieu solide permettant leur dénombrement :

- milieu BHI pour dénombrer les colonies de *L. garvieae* N201 : le fort écart de concentration cellulaire, ainsi que les différences visuelles entre les types de colonies (taille, couleur, forme), a permis de facilement distinguer les colonies correspondant à *L. garvieae* de celles de *S. aureus*.
- milieu BP pour dénombrer les colonies de *S. aureus* SA15 ou MW2 : milieu sélectif pour les staphylocoques permettant également de différencier les staphylocoques à coagulase-positif grâce à la formation de halos.

Les boîtes de Pétri ont ensuite été placées à l'étuve à 30°C (*L. garvieae*) ou 37°C (*S. aureus*) durant 48 h puis les colonies ont été dénombrées visuellement. La concentration cellulaire des cultures de départ a ensuite été déterminée à partir des comptages de boîtes contenant au moins 30 colonies et au plus 300 colonies selon le calcul :

$$\text{nombre de colonies} \times \text{facteur de dilution} \times 10 \text{ (dilution à l'étalement)}$$

II.2. Mesure de la concentration en H₂O₂ dans les cultures

A la fin des durées d'incubation, 10 mL de chaque culture ont été prélevés et centrifugés à 9600 x g durant 10 min à 4°C. Les surnageants ont été prélevés. Dans un tube eppendorf ont été mélangés dans l'ordre :

- 100 µL du surnageant
- 100 µL de 4-aminoantipyrine à 4 mg.mL⁻¹ (Sigma-Aldrich)
- 750 µL de tampon phosphate Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ à 0.1 M et pH = 7 (Sigma-Aldrich)
- 20 µL de phénol saturé à l'eau (MP Biomedicals LLC, Santa Ana, California, USA)
- 30 µL de peroxydase du raifort de type VI-A à ~1000 U.mL⁻¹ (Sigma-Aldrich) en solution dans le tampon phosphate à pH = 6

Après mélange par retournement, la concentration en peroxyde d'hydrogène a été calculée par mesure de la DO₅₀₅ du mélange et comparaison à une courbe étalon. Cette courbe étalon a été établie à partir d'une solution de peroxyde d'hydrogène à 30% (Sigma-Aldrich) diluée dans du BHI à des concentrations de 0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 3 mM et 5 mM. Régulièrement, la concentration de la solution-mère de peroxyde d'hydrogène a été mesurée par titrage (cf. protocole en annexe 3). Elle est restée stable à 30% durant les 3 années de ce travail de thèse.

III. Détermination de la réponse de *S. aureus* à son inhibition par *L. garvieae*

Méthodologie relative aux résultats du chapitre 2

La méthodologie complète expliquant ces suivis est décrite dans les paragraphes de « Materials and Methods » de l'article n°1 (disponible à la suite du chapitre 2). Les paragraphes suivants décrivent la méthodologie relative aux résultats complémentaires.

III.1. Approche génomique (partie I)

*III.1.1. Séquençage de la souche *S. aureus* SA15*

L'ADN de la souche *S. aureus* SA15 a été extrait à partir de cultures de nuit en utilisant le kit QIAamp DNA Mini (Qiagen, Venlo, Pays-Bas), en suivant le protocole fourni avec le kit. Le séquençage a été réalisé par la plateforme Get-Plage (INRA de Toulouse) en utilisant un séquenceur MiSeq (Illumina Inc., San Diego, California, USA) et en générant des reads « paired-end » (séquencés depuis les deux extrémités du fragment) de 250 pb (paires de bases). Le génome de *S. aureus* MW2 a été utilisé en tant que référence pour l'alignement. Les scores de qualité des bases des reads ont été calculés à l'aide du logiciel FastQC du Babraham Institute (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), confirmant la bonne qualité du séquençage (données non montrées). Afin d'améliorer l'assemblage, le logiciel FLASH (Magoč and Salzberg, 2011) a été préalablement utilisé pour combiner les reads se chevauchant, générant des fragments de taille variable (en moyenne environ 400 pb). L'assemblage a été réalisé en

utilisant l'algorithme SPAdes (Bankevich et al., 2012), générant 50 contigs. L'annotation a été réalisée à l'aide du logiciel Prokka (Seemann, 2014).

III.1.2. Recherche de gènes de S. aureus potentiellement impliqués dans l'inhibition par L. garvieae

Suite à l'analyse bibliographique, une liste de gènes potentiellement impliqués dans la réponse de *S. aureus* à l'antagonisme de *L. garvieae* ou dans la virulence de *S. aureus* potentiellement modulée par *L. garvieae* a été établie : *cidC*, *sodA*, *sodM*, *kataA*, *ahpC*, *ahpF*, *trxA*, *trxB*, *grx*, *gshR*, *gpo* / *gpx*, *osmC* / *ohr*, *noxA*, *noxB*, *noxE*, *lox* / *lctO*, *hrcA*, *sigB* / *rpoB*, *ctsR*, *groES*, *groEL*, *dnaK*, *dnaJ*, *grpE*, *hfq*, *ybeY*, *clpA*, *clpB*, *clpC*, *clpD*, *clpE*, *clpL*, *clpQ*, *clpP*, *clpY*, *clpX*, *recA*, *lexA*, *codY*, *agrA* / *RNAII*, *hld* / *RNAII*, *perR*, *fur*, *mraZ*, *mraW*.

Les séquences de ces gènes au format FASTA ont été récupérées sur le site du NCBI concernant les souches *S. aureus* subsp. *aureus* NCTC 8325 (RefSeq : NC_007795.1). Ces séquences ont été alignées par BLASTn sur les génomes de *S. aureus* SA15 (génome non-publié) et *S. aureus* MW2 (RefSeq : NC_003923.1) en utilisant les paramètres de l'algorithme programmés par défaut sur le site du NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome). Un gène a été considéré comme présent dans les souches de *S. aureus* SA15 et MW2 à partir d'une couverture minimale de 80% et d'une identité minimale de 70%.

III.1.3. Recherche de gènes de S. aureus SA15 et MW2 uniquement identifiés dans l'une des deux souches

Les CDS (« Coding Sequence ») de *S. aureus* SA15 ont été récupérées grâce à l'annotation du génome (cf. III.1.1.). Les CDS de *S. aureus* MW2 ont été récupérées sur le site du NCBI. Afin d'identifier les gènes présents dans le génome de *S. aureus* SA15 mais pas dans celui de *S. aureus* MW2, les CDS du génome de *S. aureus* SA15 ont été alignées sur le génome de *S. aureus* MW2 en utilisant les paramètres par défaut de l'algorithme BWA-MEM, optimisé pour l'alignement de reads longs (> 70 pb) et à forte homologie avec le génome de référence (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>). Afin d'identifier les gènes présents dans le génome de *S. aureus* MW2 mais pas dans celui de *S. aureus* SA15, la manipulation inverse a été réalisée. La fiabilité

des résultats a été validée par BLASTn sur une dizaine de CDS identifiées comme spécifiques à *S. aureus* SA15 ou MW2.

III.2. Approche phénotypique (partie III)

III.2.1. Détermination de la vitesse d'élimination du H₂O₂

Cinq cultures pures de *S. aureus* SA15 et cinq cultures pures de *S. aureus* MW2 ont été incubées sous un niveau d'aération élevé. Lorsque la DO₆₀₀ atteignait 0,1, des injections de peroxyde d'hydrogène (Sigma-Aldrich) ont été réalisées pour chaque souche à des concentrations de 0, 0,5, 1, 2 ou 4 mM. Puis, toutes les cultures ont été replacées dans l'incubateur. Après 0, 30, 60 et 120 min, 1 mL de chaque culture a été prélevé et immédiatement centrifugé à 9600 x g durant 10 min. La concentration en peroxyde d'hydrogène dans chaque surnageant a été dosée comme décrit précédemment (II.2.).

La vitesse d'élimination a été établie pour chaque intervalle de temps (0 à 30 min, 30 à 60 min, 60 à 120 min) selon le calcul :

$$vitesse\ d'elimination = \frac{[H_2O_2]\ au\ temps\ 1 - [H_2O_2]\ au\ temps\ 2}{temps\ 2 - temps\ 1}$$

IV. Détermination des mécanismes de *L. garvieae* impliqués dans l'antagonisme vis-à-vis de *S. aureus*

Méthodologie relative aux résultats du chapitre 3

La méthodologie de l'approche génomique est décrite dans l'article n°2 : genome announcement de Bornes *et al.*, pas encore soumis (disponible après la partie I du chapitre 3). La méthodologie de l'approche transcriptomique et phénotypique est décrite dans les paragraphes de « Materials and Methods » de l'article n°3 (disponible à la suite du chapitre 3). Les paragraphes suivants décrivent la méthodologie relative aux résultats complémentaires.

IV.1. Approche génomique (partie I)

*IV.1.1. Séquençage de la souche *L. garvieae* N201*

Le génome de la souche *L. garvieae* N201 a été séquençé en amont de ce projet de thèse lors d'une approche métagénomique (Almeida et al., 2014). Le projet de séquençage a été référencé (GOLD project ID : Gp0034836) mais les données n'ont pas encore été soumises sur les bases de données du NCBI. Divers traitements informatiques ont été réalisés durant ce travail de thèse et sont explicités dans le genome announcement de Bornes *et al.*, pas encore soumis, disponible après la partie I du chapitre 3.

*IV.1.2. Recherche de gènes de *L. garvieae* N201 potentiellement impliqués dans l'antagonisme vis-à-vis de *S. aureus**

La méthodologie utilisée est similaire à celle exposée paragraphe III.1.1. de la section « Méthodologie » concernant *S. aureus* SA15 et *S. aureus* MW2, avec quelques modifications. Excepté les régulateurs de la virulence (*agrA* / RNAII et *hld* / RNAPIII) et les gènes de division cellulaire (*mraZ* et *mraW*), les gènes recherchés dans le génome de *L. garvieae* N201 ont été les mêmes que ceux recherchés dans le génome de *S. aureus* SA15 et MW2. La pyruvate oxydase *pox* des lactocoques a été recherchée à la place de la pyruvate oxydase *cidC* des staphylocoques. Les séquences génétiques des gènes ciblés ont été récupérées au format FASTA à partir de la souche de *L. lactis* Il403 (RefSeq : NC_002662.1). Lorsque ces gènes n'étaient ni présents ou bien annotés dans le génome de *L. lactis* Il403 (gènes : *ohrA*, *ohrR*, *perR*, *lexA*), les séquences ont été récupérées à partir du génome de *B. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 (RefSeq : NC_000964.3).

*IV.1.3. Recherche de bactériocines dans le génome de *L. garvieae* N201*

Le génome de *L. garvieae* N201 au format FASTA a été soumis pour analyse au logiciel en ligne BAGEL3 (<http://bagel2.molgenrug.nl/index.php/bagel3>). Les résultats ont été validés par BLASTn des séquences génétiques identifiées comme codant pour des bactériocines.

IV.1.3. Détermination de gènes de virulence potentiels de *L. garvieae* N201, Lg2, *L. lactis* Il1403, *Streptococcus pneumoniae* R6, *S. aureus* SA15 et MW2

La présence de gènes de virulence répertoriés dans la base de donnée VFDB (« Virulence Factors DataBase » : <http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>) a été recherchée dans les génomes de *L. garvieae* N201, Lg2 (RefSeq : NC_017490.1), *L. lactis* Il1403, *Streptococcus pneumoniae* R6 (RefSeq : NC_003098.1), *S. aureus* SA15 et MW2 en utilisant les paramètres de l'algorithme BLASTx programmés par défaut sur le site du NCBI. La présence des gènes codant pour les hémolysines LCGL_0323 / LCGL_RS11635 (gene ID : 12478867), LCGL_0597 / LCGL_RS12985 (gene ID : 12479143) et LCGL_0374 / LCGL_RS11890 (gene ID : 12478919) et des 15 gènes appartenant au cluster de la capsule de *L. garvieae* Lg2 (gene ID de 12478977 à 12478992) a également été recherchée par BLASTn.

IV.2. Approche transcriptomique (partie II)

IV.2.1. Préparation des échantillons en vue du RNA sequencing

Les échantillons biologiques utilisés correspondaient à des cultures pures de *L. garvieae* ou co-culture de *L. garvieae* + *S. aureus* SA15, sous un niveau d'aération faible ou élevé, après 9 h, et sont décrits dans l'article n°3 (disponible à la suite du chapitre 3). La déplétion préliminaire des ARNr a été effectuée en utilisant un kit Magnetic Ribo-Zero pour bactéries à Gram⁺ (fabricant au moment du travail : tebu-bio Sas, Le-Perray-en-Yvelines, France ; fabricant actuel : Illumina Inc.) car la plateforme MGX (Montpellier GenomiX) ne pouvait pas réaliser cette étape. Le protocole fourni par le fabricant a été utilisé avec une modification : la déplétion des ARNr a été effectuée deux fois par échantillon d'ARN. Le protocole utilisé complet est disponible en annexe 4.

IV.3. Approche phénotypique (partie III)

*IV.3.1. Détermination du potentiel d'oxydo-réduction dans les cultures de *L. garvieae* N201 et *S. aureus* SA15*

Le potentiel d'oxydo-réduction a été mesuré au court du temps grâce à un système CINAC (Alliance Instruments, AMS France, Frépillon, France). Cependant, les conditions utilisées pour les autres expériences n'ont pas pu être correctement reproduites dans cette expérience.

La condition d'aération élevée décrite dans la méthodologie, en I., n'a pas pu être reproduite car les sondes de l'appareil ne pouvaient correctement entrer dans l'incubateur à cause des câbles et que la fragilité des sondes empêchait une agitation élevée sur plateau. Plusieurs conditions proches ont été testées : en bouteille Schott ou erlenmeyers, avec agitation dans un bain-marie agitant ou grâce à un barreau magnétique. Aucun résultat « satisfaisant » comparé à la condition d'aération élevée utilisée dans les autres expériences n'a été obtenu : la concentration en peroxyde d'hydrogène dans les cultures contenant *L. garvieae* était faible, voire indétectable.

La condition d'aération faible décrite dans la méthodologie, en I., n'a pas pu être reproduite car les sondes ne pouvaient être placées de manière hermétique dans les tubes de 50 mL (pas d'ouverture, sondes trop longues). Une condition proche a ainsi été utilisée : incubation de 500 mL de culture dans des bouteilles Schott de 500mL, sans agitation, au bain-marie à 30°C. Le bon maintien de la température et du pH durant l'expérience a été vérifié par le système CINAC.

Ainsi, l'évolution du potentiel d'oxydo-réduction dans des cultures pures et co-cultures de *L. garvieae* N201 et *S. aureus* SA15 et dans du BHI non-inoculé a été déterminé durant 24 h dans les conditions décrites dans le paragraphe I. de la section « Méthodologie », en condition d'aération faible avec les modifications décrites dans le paragraphe précédent. Excepté pour la culture pure de *L. garvieae* N201 (duplicat), les suivis n'ont été réalisés qu'une seule fois.

*IV.3.2. Effet d'un surnageant de co-culture sur la croissance de *S. aureus* en bouillon de culture*

La méthodologie de cette expérience a été explicitée dans le dernier paragraphe de la section « Materials and Methods » de l'article n°3 (disponible à la suite du chapitre 3), mais un exemple de protocole utilisé est également disponible en annexe 5. Cet exemple concerne l'étude de l'effet de surnageants de co-culture de *L. garvieae* / *S. aureus* SA15, culture pure de *L. garvieae* ou de

BHI non-inoculé, non-traités ou traités à la protéinase K ou à la pronase E ou aux deux enzymes (seul le dernier traitement a été discuté dans ce manuscrit), sur la croissance d'une culture pure de *S. aureus*.

RESULTATS

Les résultats sont divisés en trois chapitres.

Le **chapitre 1** présente les résultats de suivis de croissance et de concentration en H_2O_2 pour des cultures de *L. garvieae* ou *S. aureus* (deux souches différentes) en interaction ou non et sous un niveau d'aération faible ou élevé.

Le **chapitre 2** présente les résultats traitant de la réponse de *S. aureus* (deux souches différentes) à l'antagonisme engendré par *L. garvieae*.

Le **chapitre 3** présente les résultats concernant les mécanismes de *L. garvieae* impliqués dans cet antagonisme vis-à-vis de *S. aureus*.

Ces résultats ont fait l'objet de trois articles, décrits dans les chapitres et parties concernées.

Chapitre 1

Croissance de *S. aureus* et *L. garvieae* en
interaction sous différents niveaux d'aération

Chapitre 1

Croissance de *S. aureus* et *L. garvieae* en interaction sous différents niveaux d'aération

La maîtrise et l'optimisation des processus de biopréservation nécessite de mieux comprendre les mécanismes d'interaction microbienne sous-jacents. Ainsi, ce travail de thèse visait à mieux caractériser l'antagonisme de *Lactococcus garvieae* contre la croissance de *Staphylococcus aureus*. Cet antagonisme a déjà été observé en fromage, en lait et *in vitro* (Alomar et al., 2008a, 2008b; Delbes-Paus et al., 2010). Le niveau d'aération des cultures peut moduler cet antagonisme *in vitro* (Delbes-Paus et al., 2010).

Dans ce chapitre, les résultats de l'étude de la croissance des deux acteurs de l'antagonisme en interaction ou non et selon différents niveaux d'aération sont décrits. Deux souches de *S. aureus* ont été comparées : la souche laitière SA15 sur laquelle l'inhibition par *L. garvieae* a été initialement observée et étudiée (Alomar et al., 2008a, 2008b; Delbes-Paus et al., 2010), et la souche humaine pathogène MW2 sur laquelle l'inhibition par *L. lactis* a fait l'objet de plusieurs publications (Cretenet et al., 2011; Even et al., 2009; Nouaille et al., 2014, 2009).

Les résultats issus de ce travail, couplés à ceux du chapitre 2, ont fait l'objet d'un article paru en 2015 dans Food Microbiology :

Article n°1 : Food Microbiology (2015)

« *Staphylococcus aureus* transcriptomic response to inhibition by H₂O₂-producing *Lactococcus garvieae* »

Pierre Delpech, Stéphanie Bornes, Elina Alaterre, Muriel Bonnet, Geneviève Gagne, Marie-Christine Montel, Céline Delbès

I.1. Matériel et méthodes

La méthodologie relative à ce travail est disponible dans les chapitres I. et II. de la section « Méthodologie » du manuscrit ainsi que dans les paragraphes 2.1 et 2.3 de l'article n°1, disponible à la suite du Chapitre 2.

I.2. Résultats

Nous avons déterminé l'évolution de la concentration cellulaire de *L. garvieae* N201 et *S. aureus* SA15 dans les conditions de culture explicitées en méthodologie : *in vitro* (BHI), 30°C, durant 24 h, sous un niveau d'aération élevé ou faible, en culture pure ou en co-culture. Les moyennes pour trois réplicats biologiques sont exposées Figure 8 (les valeurs sont également indiquées dans le tableau 2 de l'article n°1, disponible à la suite du chapitre 2).

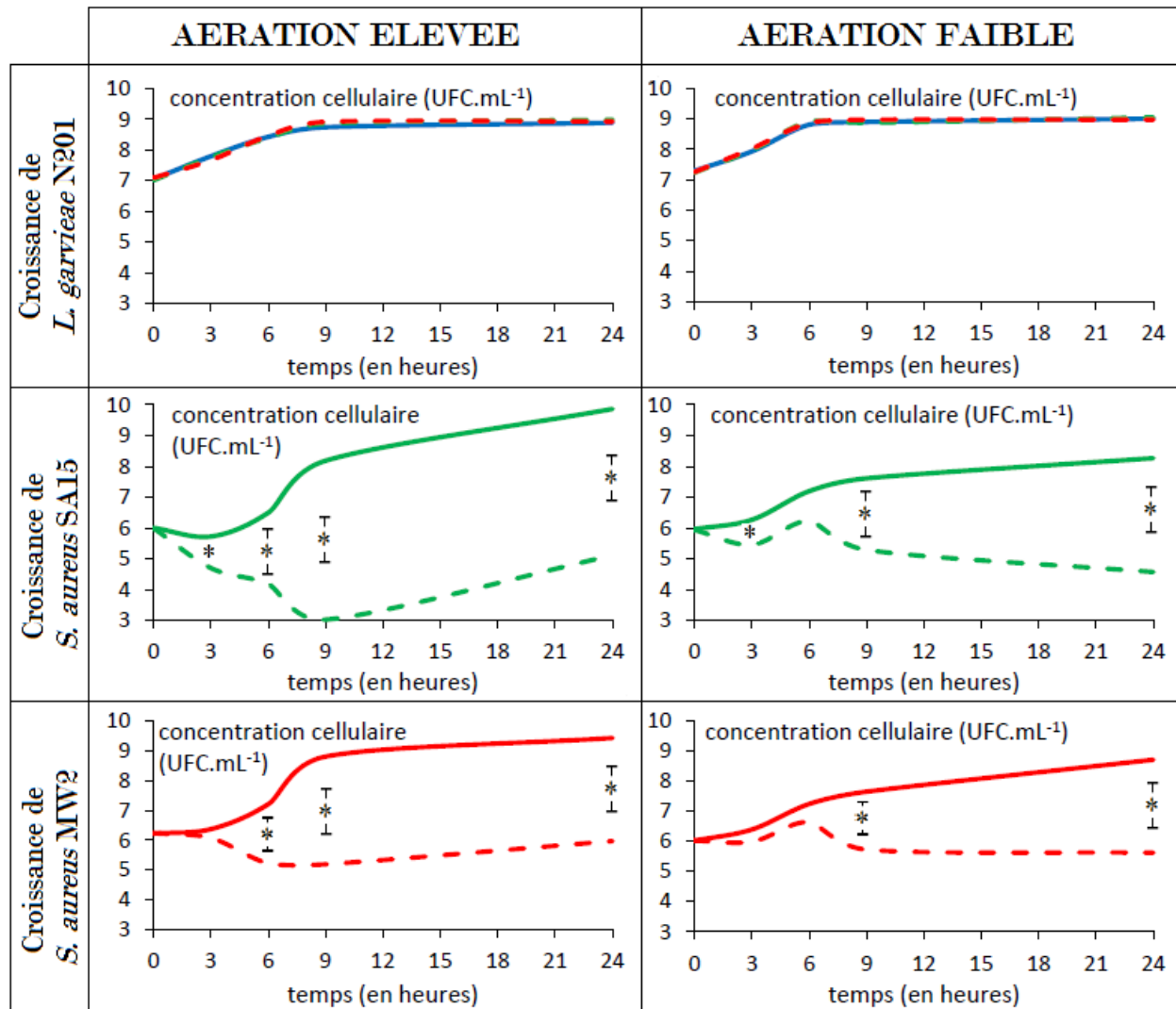
La croissance de *L. garvieae* N201 n'a jamais été affectée ni par le niveau d'aération ni par la présence de *S. aureus* SA15 ou de *S. aureus* MW2.

La croissance de *S. aureus* SA15 a été fortement inhibée sous un niveau d'aération élevé par la présence de *L. garvieae*, *S. aureus* atteignant une concentration cellulaire minimale à 9 h. Sous un niveau d'aération faible, une inhibition de *S. aureus* par *L. garvieae* a également été observée, mais plus modérée que sous un niveau d'aération élevé. L'inhibition maximale sous un faible niveau d'aération a été plutôt observée après 24 h. Les résultats étaient en adéquation avec les résultats déjà obtenus dans le cadre de l'interaction entre *L. garvieae* N201 et *S. aureus* SA15 (Alomar et al., 2008a, 2008b; Delbes-Paus et al., 2010).

Concernant *S. aureus* MW2, les profils d'inhibition de croissance étaient similaires à ceux observés pour *S. aureus* SA15. Cependant, sous un niveau d'aération élevé, *S. aureus* MW2 a été significativement moins inhibé que *S. aureus* SA15, suggérant une meilleure résistance à l'inhibition sous aération de cette souche. Sous un niveau d'aération faible, l'inhibition de *S. aureus* SA15 et *S. aureus* MW2 par *L. garvieae* N201 a été similaire.

Ces résultats ont révélé deux profils d'inhibition différents des deux souches de *S. aureus* étudiés, suggérant une sensibilité différente à l'antagonisme de *L. garvieae*. Le candidat principal pour expliquer l'inhibition de croissance étant le peroxyde d'hydrogène, la concentration en H₂O₂ a été mesurée dans toutes ces cultures à 0 h, 6 h, 9 h et 24 h.

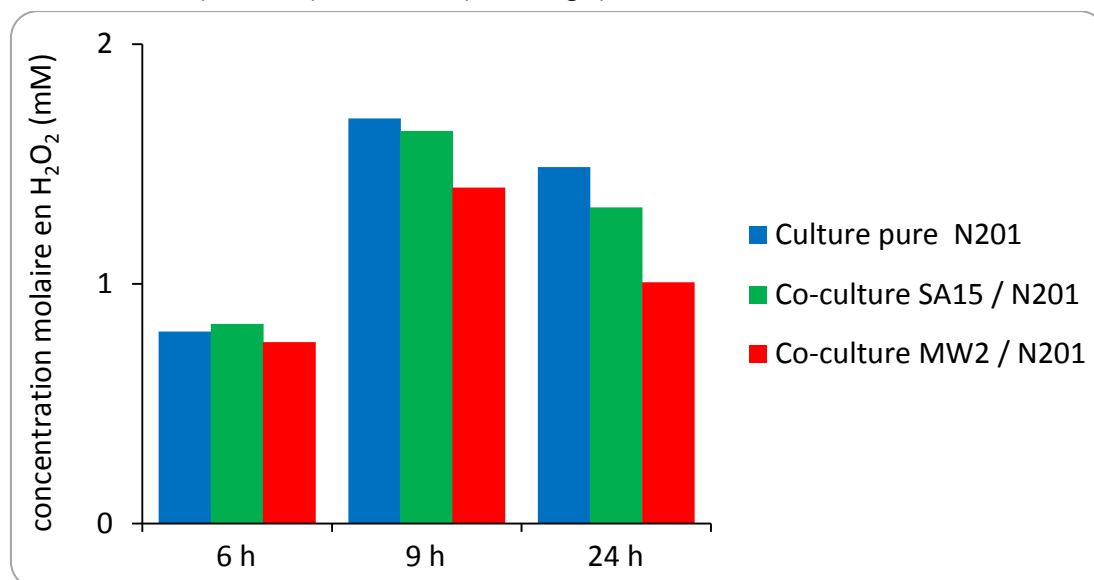
Figure 8. Croissance de *L. garvieae* N201, *S. aureus* SA15 ou MW2 en culture pure (traits pleins) ou co-culture avec l'autre espèce bactérienne (pointillés) durant une cinétique de 24 h sous aération élevée ou sous aération faible. Concernant la croissance de *L. garvieae*, les pointillés rouges correspondent à la co-culture avec *S. aureus* MW2, les résultats en co-culture avec *S. aureus* SA15 ont été similaires.



Les différences significatives ($p\text{-value} < 0,05$) calculées à 0 h, 3 h, 6 h, 9 h et 24h sont indiquées par un astérisque.

Le peroxyde d'hydrogène a été détecté uniquement à partir de 6 h dans les cultures où *L. garvieae* était présent et sous un niveau d'aération élevé. Les résultats pour ces conditions sont exposés en Figure 9.

Figure 9. Concentration en peroxyde d'hydrogène (en mM) mesurée dans les cultures sous aération de *L. garvieae* N201 inoculé seul (en bleu) ou en co-culture avec *S. aureus* SA15 (en vert) ou MW2 (en rouge) à 6 h, 9 h et 24 h.



Pour chaque temps aucune différence significative n'a été observée entre les mesures des trois types de culture.

La concentration en H_2O_2 a atteint un pic à 9 h à environ 1,5 mM selon les cultures, concomitant avec la concentration minimale de *S. aureus* observée en co-culture sous aération. La présence de *S. aureus* SA15 ou MW2 n'a pas affecté significativement la concentration en H_2O_2 . Cependant, la concentration en H_2O_2 tendait à diminuer dans les co-cultures, plus particulièrement avec *S. aureus* MW2. De plus, la différence entre la concentration en H_2O_2 mesurée dans la culture pure et celle mesurée dans les co-cultures était significativement plus faible concernant la co-culture contenant *S. aureus* SA15 comparé à celle contenant *S. aureus* MW2 après 9 h et 24 h de culture.

I.3. Conclusion

Ces premiers résultats concernant l'étude de l'effet de l'interaction bactérienne et de l'aération sur la croissance de *L. garvieae* et de deux souches de *S. aureus* et la concentration en H_2O_2 ont permis de révéler que :

- la croissance de *L. garvieae* N201 n'a été modifiée ni par l'aération ni par *S. aureus*,
- la production de H_2O_2 par *L. garvieae* N201 a été fortement induite par un niveau d'aération élevé (non détectable sous un niveau d'aération faible),

- la concentration en peroxyde d'hydrogène pourrait être légèrement amoindrie par la présence de *S. aureus* (surtout MW2),
- la croissance de *S. aureus* (SA15 et MW2) a été inhibée par la présence de *L. garvieae* quel que soit le niveau d'aération mais plus fortement lorsque l'aération était élevée,
- la croissance de *S. aureus* MW2 est moins fortement inhibée que celle de *S. aureus* SA15 sous un niveau d'aération élevé.

Concernant *S. aureus*, ces expériences ont permis de suggérer une réponse différente des deux souches de *S. aureus* à l'inhibition engendrée par *L. garvieae* sous un niveau d'aération élevé. Deux hypothèses pourraient être envisagées. Premièrement, *S. aureus* MW2 pourrait dégrader plus efficacement le peroxyde d'hydrogène que *S. aureus* SA15. Cette hypothèse est appuyée par le fait que la concentration en H₂O₂ dans la co-culture *L. garvieae* / *S. aureus* MW2 tende à être moins élevée que dans la co-culture *L. garvieae* / *S. aureus* SA15. Secondement, *S. aureus* MW2 pourrait mieux résister à l'inhibition provoquée par la présence de H₂O₂ que *S. aureus* SA15, ce qui pourrait être dû à une expression différente des gènes de réponse au H₂O₂ ou de réponse au stress. Ces hypothèses ont été testées dans le chapitre 2.

Concernant *L. garvieae*, le peroxyde d'hydrogène jouant un rôle clef dans l'inhibition de *S. aureus*, dépendant du niveau d'aération, son métabolisme chez *L. garvieae* doit être caractérisé. En effet, plusieurs questions restent en suspens :

Est-ce que la plus forte production de H₂O₂ sous un niveau d'aération élevé s'explique par une modulation de l'expression des gènes liés à ce métabolisme ? Est-ce que l'inhibition de *S. aureus* provoquée par *L. garvieae* est due à des mécanismes moléculaires induits par la présence de *S. aureus* ou exprimés également en culture pure ?

De plus, il est intéressant de noter que cette bactérie a été capable d'inhiber *S. aureus* en absence d'aération alors que le peroxyde d'hydrogène n'avait pas été détecté. Ces résultats appuient l'hypothèse de l'implication d'au moins un effecteur différent du H₂O₂ dans cette inhibition, suggérée par Delbes-Paus et al. (2010). Ces diverses hypothèses ont été testées dans le chapitre 3.

Chapitre 2

Réponse de *S. aureus* à l'inhibition de
croissance causée par *L. garvieae*

Chapitre 2

Réponse de *S. aureus* à l'inhibition de croissance causée par *L. garvieae*

Les résultats du chapitre 1 ont permis de conclure que la réponse de *S. aureus* à l'inhibition par *L. garvieae* pouvait varier selon la souche, et suggérer ainsi des mécanismes de défense vis-à-vis de cette inhibition différents entre la souche *S. aureus* SA15 et MW2. L'étude bibliographique a permis d'identifier plusieurs acteurs moléculaires potentiellement impliqués dans cette réponse. Dans une première partie, nous avons recherché les différences entre le génome de ces deux souches de *S. aureus*, particulièrement au niveau des gènes potentiellement impliqués dans la réponse à l'inhibition par *L. garvieae*. Dans une deuxième partie, l'expression de ces acteurs moléculaires en fonction du niveau d'aération et de la présence de *L. garvieae* a été déterminée afin de mieux comprendre les mécanismes de défense de *S. aureus* et d'identifier des différences de régulations entre les deux souches expliquant leur différence d'inhibition. Dans une troisième partie, nous avons effectué une description phénotypique de la réponse au peroxyde d'hydrogène (dégradation et survie) par les deux souches de *S. aureus* afin d'expliquer leur différence et de faire le lien avec les mécanismes mis en avant par l'approche génomique et transcriptomique. L'approche transcriptomique couplée à la description phénotypique ont fait l'objet d'un article paru en 2015 dans Food Microbiology :

Article n°1 : Food Microbiology (2015)

« *Staphylococcus aureus* transcriptomic response to inhibition by H₂O₂-producing *Lactococcus garvieae* »

Pierre Delpech, Stéphanie Bornes, Elina Alaterre, Muriel Bonnet, Geneviève Gagne, Marie-Christine Montel, Céline Delbès

PARTIE I : APPROCHE GENOMIQUE

I.1. Matériel et méthodes

La méthodologie relative à ce travail est disponible dans le paragraphe III.1. de la section « Méthodologie » du manuscrit.

I.2. Résultats

Afin de mieux identifier des mécanismes potentiels pouvant expliquer les différences de croissance entre les deux souches de *S. aureus* en présence de *L. garvieae*, il était nécessaire d'analyser le génome des deux souches de *S. aureus* étudiées. Le génome de la souche MW2 était disponible (référence NCBI : NC_003923.1). Pour ce projet, nous avons également séquencé et annoté le génome de la souche SA15. Celui-ci comporte 2639 gènes (donc 2567 identifiés comme codants) répartis dans 50 scaffolds pour une longueur totale de 2,8Mb et un G-C% de 32,8%. Aucun plasmide n'a été identifié. Ces résultats sont dans la norme des données disponibles pour les souches déjà séquencées de *S. aureus*.

Les données issues de ce séquençage de *S. aureus* SA15 et du génome déjà disponible de *S. aureus* MW2 nous ont permis dans un premier temps d'identifier les gènes présents dans les génomes des deux souches et potentiellement impliqués dans la réponse à *L. garvieae*. Les principaux gènes de régulation de la virulence ont également été recherchés, l'expression de ceux-ci pouvant être modulée par la présence de *L. garvieae*. Dans un deuxième temps, les données nous ont permis de comparer le génome des deux souches afin d'émettre des hypothèses pour expliquer leurs différences en présence de *L. garvieae*.

Ainsi, nous avons pu valider la présence dans les deux souches de *S. aureus* des principaux gènes potentiellement impliqués dans la réponse à l'antagonisme engendré par *L. garvieae* (Tableau 16). La liste des gènes et voies métaboliques ciblés a été établie à partir de la synthèse bibliographique présentée précédemment.

Tableau 16. Gènes identifiés dans les souches de *S. aureus* SA15 ou MW2 potentiellement impliqués dans la virulence et / ou la réponse de *S. aureus* à *L. garvieae* N201.

Fonction	Catégorie de gènes	Nombre de gènes identifiés		Dénomination ^a
		SA15	MW2	
Synthèse du H₂O₂	pyruvate oxydase	1	1	<i>cidC</i>
	superoxyde dismutase	2	2	<i>sodA, sodM</i>
Dégradation du H₂O₂	catalase <i>katA</i>	1	1	<i>katA</i>
	alkyl hydroperoxydase	2	2	<i>ahpC, ahpF</i>
	thiorédoxine	2	2	<i>trxA1, trxA2</i>
	thiorédoxine reductase	1	1	<i>trxB</i>
	glutarédoxine	0	0	
	glutarédoxine réductase	0	0	
	glutathion peroxydase	1	1	<i>gpx</i> ou <i>gpo</i>
Dégradation des autres	famille <i>osmC</i> / <i>ohr</i>	1	1	<i>osmC</i>
Régulateurs de la réponse au stress	<i>hrcA</i>	1	1	<i>hrcA</i>
	facteur sigma B	1	1	<i>rpoB</i>
	<i>ctsR</i>	1	1	<i>ctsR</i>
Chaperonnes	<i>groES</i>	1	1	<i>groES</i>
	<i>groEL</i>	1	1	<i>groEL</i>
	<i>dnaK</i>	1	1	<i>dnaK</i>
	<i>dnaJ</i>	1	1	<i>dnaJ</i>
	<i>grpE</i>	1	1	<i>grpE</i>
	<i>hfq</i>	1	1	<i>hfq</i>
	<i>ybeY</i>	1	1	<i>ybeY</i>
ATPases et protéases de type Clp	<i>clpB</i>	1	1	<i>clpB</i>
	<i>clpC</i>	1	1	<i>clpC</i>
	<i>clpD</i>	0	0	
	<i>clpE</i>	0	0	
	<i>clpQ</i>	1	1	<i>clpQ</i>
	<i>clpY</i>	0	0	
	<i>clpX</i>	1	1	<i>clpX</i>
	<i>clpL</i>	1	1	<i>clpL</i>
	<i>clpP</i>	1	1	<i>clpP</i>
Régulateurs de la réponse SOS	<i>recA</i>	1	1	<i>recA</i>
	<i>lexA</i>	1	1	<i>lexA</i>
Virulence et autres régulations	gènes <i>agrABCD</i>	4	4	<i>agrABCD</i>
	<i>hld</i> / <i>RNAIII</i>	1	1	<i>hld</i> / <i>RNAIII</i>
	gènes du TCS SaeRS	2	2	<i>saeR, saeS</i>
	gènes du TCS SrrAB	2	2	<i>srrA, srrB</i>
	<i>codY</i>	1	1	<i>codY</i>
	entérotoxines	2	6	^b
Homéostasie des métaux	<i>perR</i>	1	1	<i>perR</i>
	<i>fur</i>	1	1	<i>fur</i>
Division cellulaire	<i>mraZ</i>	1	1	<i>mraZ</i>
	<i>mraW</i>	1	1	<i>mraW</i>

Les gènes ont été identifiés par BLASTn. Excepté les différences au niveau des entérotoxines ^b, les gènes identifiés pour les deux souches sont homologues.

^a sur la base de l'annotation RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) ou des homologues identifiées

^b gènes codant pour des entérotoxines identifiés dans les génomes : 2 (C et L) pour SA15 et 6 (A, C, G/I/Q, H, L, K) pour MW2. La similarité de séquences entre les gènes codant l'entérotoxine G, I et Q n'a pas permis de bien les différencier.

Normalement absents du génome des staphylocoques, aucun gène codant pour une NADH déshydrogénase ou une NADH oxydase n'a été identifié dans les génomes de *S. aureus* SA15 et *S. aureus* MW2 (données non montrées). La consommation en O₂ via l'ETC (Electron-Transport Chain, Chaîne Respiratoire) pourrait alors être effectuée via les ménaquinones ou directement les oxydases terminales. De plus, les deux souches disposent des mêmes gènes préalablement identifiés dans ces mécanismes de défense, que cela soit au niveau de la dégradation du H₂O₂ et de la réponse aux stress (dont oxydatif).

Concernant les mécanismes de virulence, elles disposent également des mêmes gènes principalement impliqués dans la régulation de la virulence. Néanmoins, la souche *S. aureus* SA15 ne dispose que de deux gènes codant pour des entérotoxines (C et L). Ces gènes sont également présents dans la souche MW2, qui en compte quatre supplémentaires (A, G, H et K). La présence de ces six entérotoxines a été vérifiée et validée par PCR (données non montrées, amorces issues de Even et al., 2009). Un gène codant pour l'entérotoxine E a également été identifié dans les deux génomes, mais avec comme référence une séquence « discontinue » de la base de données du NCBI, c'est-à-dire avec une annotation peu fiable.

La comparaison des deux génomes par mapping des CDS de l'une des souches sur le génome de l'autre avec l'algorithme BWA-MEM (cf. annexe 6) a permis de confirmer les résultats des BLASTn au niveau des gènes ciblés. Plusieurs gènes identifiés dans le génome de MW2 et non identifiés dans le génome de SA15 correspondent à des gènes de virulence potentiels ou avérés, suggérant que la souche MW2 serait plus virulente que la souche SA15. Néanmoins, cette dernière dispose du gène *tstI*, codant pour la toxine TSST-1, alors que la souche MW2 n'en dispose pas. Nous avons également noté que la souche MW2 disposait du gène de synthèse de l'hydroxyméthylglutaryl-CoA alors que ce gène était absent du génome de *S. aureus* SA15. Ce gène est impliqué dans la voie de synthèse de l'isopentényl-pyrophosphate, principal précurseur des isoprénoïdes, et est donc une cible d'antibiotiques contre les staphylocoques en clinique humaine (Campobasso et al., 2004). La comparaison des deux génomes a également révélé la présence de deux transporteurs du cobalt dans le génome de *S. aureus* MW2, absents de celui de *S. aureus* SA15, suggérant des différences dans l'homéostasie ou l'internalisation du cobalt entre les deux souches. Cependant, un grand nombre de gènes exclusifs à l'une ou à l'autre des deux souches correspondent à des gènes d'origine phagique, aux fonctions hypothétiques, mal annotés

et / ou à des potentiels régulateurs aux cibles encore mal décrites. Une meilleure annotation serait nécessaire pour mieux identifier les différences génomiques entre les deux souches de *S. aureus*.

I.3. Conclusion

Ces résultats ont montré que les deux souches de *S. aureus* étaient proches génomiquement. Ils suggèrent que la différence de réponse à l'inhibition par *L. garvieae* entre les deux souches s'expliquerait plutôt par des régulations de ces gènes que par la présence ou l'absence de certains gènes importants. Il est ainsi nécessaire d'évaluer les variations transcriptomiques de ces gènes durant l'inhibition par *L. garvieae*. Le niveau d'expression des entérotoxines communes aux deux souches (C et L) devra également être analysé durant l'antagonisme engendré par *L. garvieae*, afin de déterminer si la bactérie lactique est capable de moduler ces facteurs de virulence de *S. aureus*.

PARTIE II : APPROCHE TRANSCRIPTOMIQUE

II.1. Matériel et méthodes

La méthodologie relative à ce travail est décrite dans les paragraphes 2.4 et 2.5 de l'article n°1, disponible à la suite du Chapitre 2.

II.2. Résultats

L'expression de 12 gènes de *S. aureus* SA15 et MW2 potentiellement impliqués dans la réponse à l'inhibition par *L. garvieae* a été déterminée à 6 h, 9 h et 24 h. Ces gènes ont été choisis grâce à l'étude bibliographique révélant leur rôle important dans la réponse au H₂O₂, à l'aération ou à la présence de *L. lactis* (cf. Etude bibliographique) et suite à l'analyse des génomes de *S. aureus* SA15 et *S. aureus* MW2. Les résultats, couplés à ceux de la partie III, ont été publiés dans Food Microbiology en 2015 (article n°1, consultable à la suite du chapitre III). Les résultats décrits ci-dessous concernent les tableaux 3, 4 et 5 de cet article.

Dans un premier temps, nous avons évalué l'expression dans les deux souches de *S. aureus* de gènes impliqués de manière directe dans la résistance au H₂O₂ : *katA*, *sodA* et *ahpF*. Nous avons alors pu observer une différence significative entre les deux souches. La présence de *L. garvieae* induisait une forte répression des principaux gènes de réponse au H₂O₂ de *S. aureus* SA15 *katA* et *sodA* alors que l'expression de ces gènes restait stable chez *S. aureus* MW2. L'expression de *ahpF* n'était pas modifiée par la présence de *L. garvieae* chez *S. aureus* SA15 alors que ce gène était surexprimé chez *S. aureus* MW2. Cela suggère que les activités enzymatiques de *S. aureus* impliquées dans la résistance au H₂O₂ pourraient être diminuées par la présence de *L. garvieae*, particulièrement dans le cas de *S. aureus* SA15. De manière cohérente, il a déjà été observé que l'activité catalasique de *S. aureus* SA15 était diminuée en co-culture par rapport à une culture pure (Alomar, 2007). Ainsi, l'expression de ces gènes de résistance au H₂O₂ joue probablement un rôle important dans l'inhibition de *S. aureus* par *L. garvieae*.

Dans un deuxième temps, nous avons suivi l'expression de gènes de réponse au stress, dont le stress oxydatif : *ctsR*, *clpC*, *dnaK*. Ces gènes étaient fortement réprimés par l'aération en présence de *L. garvieae* (donc en présence de H₂O₂) chez les deux souches de *S. aureus* et

également réprimés par la présence de *L. garvieae* concernant *S. aureus* MW2. La fonction de ces gènes étant importante pour la croissance de *S. aureus* en condition de stress, entre autres en cas d'exposition au H₂O₂ (Chatterjee et al., 2005; Krüger et al., 1994; Singh et al., 2007), nous avons supposé que la répression de ces gènes par *L. garvieae* pouvait jouer un rôle important dans l'inhibition, spécialement en aération et en présence de H₂O₂.

Troisièmement, nous avons également constaté que les deux premiers gènes du cluster *dcw* des deux souches de *S. aureus*, *mraW* et *mraZ*, étaient fortement réprimés par la présence de *L. garvieae* en aération. L'expression de ces gènes étant fortement liée à celle de tout le cluster de division cellulaire *dcw* (cf. Etude bibliographique), ce résultat suggérait que *L. garvieae* pouvait également affecter les mécanismes de division cellulaire dans ces conditions.

Quatrièmement, nous avons également observé que *L. garvieae* pouvait moduler l'expression des principaux gènes de virulence de *S. aureus*. En effet, la présence de *L. garvieae* et le niveau d'aération a fortement modifié l'expression de *agrA* / RNAIL, *hld* / RNAIIL mais aussi des régulateurs *codY*, *srrA* et *saeS*. L'expression des gènes codant pour les entérotoxines C et L de *S. aureus* SA15 était très faible comparé à deux de *S. aureus* MW2. Ces gènes étaient réprimés chez *S. aureus* MW2 par la présence de *L. garvieae* à 9 h, ce qui pourrait induire une baisse de la production de ces entérotoxines.

I.3. Conclusion

Ces résultats ont permis de proposer trois mécanismes de *S. aureus* potentiellement impliqués dans son inhibition par *L. garvieae* : la réponse au H₂O₂, la réponse au stress oxydatif et la division cellulaire. La présence de *L. garvieae* semble également moduler la virulence de *S. aureus*. La différence de réponse transcriptomique des deux souches de *S. aureus* concernant les gènes de réponse au H₂O₂ a permis de souligner l'importance de cette voie dans la réponse propre à chaque souche. Deux hypothèses ont alors été formulées pour expliquer ces différences et les lier aux profils d'inhibition :

- la souche MW2 aurait de meilleures capacités de dégradation du H₂O₂,
- la souche MW2 aurait de meilleures capacités de survie en présence de H₂O₂.

PARTIE III : APPROCHE PHENOTYPIQUE

III.1. Matériel et méthodes

La méthodologie relative à ce travail est disponible dans le chapitre III.2. de la section « Méthodologie » du manuscrit ainsi que dans le paragraphe 2.2 de l'article n°1, disponible à la suite du Chapitre 2.

III.2. Résultats

Afin de vérifier les hypothèses formulées dans la partie II, nous avons évalué la vitesse d'élimination du H_2O_2 et la survie en présence de H_2O_2 des souches *S. aureus* SA15 et MW2. Les résultats, couplés à ceux de la partie II, ont fait l'objet d'une publication dans Food Microbiology en 2015 (article n°1, disponible à la fin de ce chapitre).

III.2.1. Hypothèse 1 : vitesse d'élimination du H_2O_2

La vitesse d'élimination du H_2O_2 par les deux souches de *S. aureus* en culture pure aérée a été évaluée. Les résultats sont exposés tableau 17.

Tableau 17. Vitesse d'élimination du peroxyde d'hydrogène après injection de H_2O_2 dans des cultures aérées de *S. aureus* SA15 et MW2 à $DO_{600}=0,1$.

Intervalle de temps	Vitesse d'élimination du H_2O_2 ($\mu M \cdot min^{-1}$) ^a					
	0 à 30 min		30 à 60 min		60 à 120 min	
Souche de <i>S. aureus</i>	SA15	MW2	SA15	MW2	SA15	MW2
Après injection de 0,5 mM de H_2O_2	4,77	2,75	0,61	0,11	0,05	0,15
Après injection de 1 mM de H_2O_2	12,69	14,13	0,55	0,92	-0,12	0,00
Après injection de 2 mM de H_2O_2	32,68	32,89	4,72	3,86	1,45	0,69
Après injection de 4 mM de H_2O_2	72,04	69,21	12,04	15,49	2,45	4,21

^a le calcul correspondant est détaillé dans la section « Méthodologie ». Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les deux souches pour un même intervalle et une même concentration en H_2O_2 injectée.

Nous avons ainsi constaté que les deux souches de *S. aureus* disposaient, en début de phase exponentielle ($DO_{600}=0,1$), des mêmes capacités d'élimination du H_2O_2 à des concentrations comprises entre 0,5 mM et 4 mM (proches de celles mesurées en co-culture avec *L. garvieae*).

III.2.1. Hypothèse 2 : survie en présence de H_2O_2

La survie des deux souches de *S. aureus* dans les mêmes conditions que précédemment (début de phase exponentielle, aération) a été évaluée 2h après exposition à des concentrations en peroxyde d'hydrogène comparables (de 0,5 mM à 4 mM). Nous avons alors observé que la survie de *S. aureus* MW2 à ces concentrations était supérieure à celle de *S. aureus* SA15, confirmant cette hypothèse (article n°1 : figure 1).

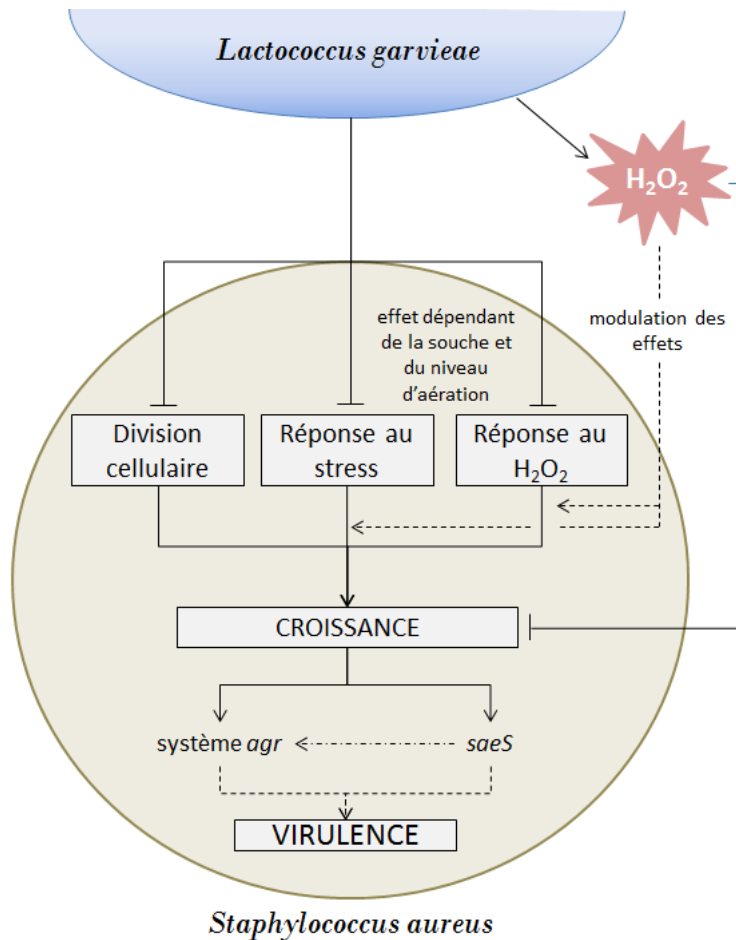
I.3. Conclusion

La meilleure capacité de *S. aureus* MW2 à survivre en présence de H_2O_2 est probablement responsable de sa plus faible inhibition en présence de *L. garvieae* comparée à celle de *S. aureus* SA15.

CHAPITRE 2 : BILAN

Ce travail a permis de souligner l'importance pour *S. aureus* de ses mécanismes de réponse au H_2O_2 , dont les acteurs seraient entre autres *kata*, *ahpF* et *sodA*, dans la survie durant l'inhibition causée par *L. garvieae*. En plus de confirmer l'importance de cette voie métabolique, nos résultats ont permis de proposer deux autres mécanismes moléculaires impliqués dans l'antagonisme de *L. garvieae* contre *S. aureus* : i) la répression par l'aération de gènes de réponse au stress oxydatif pourrait également jouer un rôle clef en présence de H_2O_2 , ii) la répression de *mraZ* et *mraW* en présence de *L. garvieae* reflétant probablement celle de nombreux gènes de division cellulaire suggère un effet inhibiteur de *L. garvieae* sur la division cellulaire de *S. aureus*. La figure 10 résume les résultats discutés précédemment.

Figure 10. Schéma simplifié des trois mécanismes moléculaires proposés menant à l'inhibition de *S. aureus* par *L. garvieae*.



Article n°1 : *Staphylococcus aureus* transcriptomic response to inhibition by H₂O₂-producing *Lactococcus garvieae*

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002015001082>

Pages 111 à 118.



Staphylococcus aureus transcriptomic response to inhibition by H₂O₂-producing *Lactococcus garvieae*



Pierre Delpech^a, Stéphanie Bornes^b, Elina Alaterre^{a,1}, Muriel Bonnet^b,
Geneviève Gagne^b, Marie-Christine Montel^a, Céline Delbès^{a,*}

^a INRA, UR545, Unité de Recherches Fromagères, 20 côte de Reyne, 15000 Aurillac, France

^b Laboratoire de Biologie, IUT Génie Biologique, Université d'Auvergne, 100 rue de l'Égalité, 15013 Aurillac, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 December 2014

Received in revised form

26 May 2015

Accepted 28 May 2015

Available online 29 May 2015

Keywords:

Lactococcus garvieae

Staphylococcus aureus

Hydrogen peroxide

Stress response

Cell division

RT-qPCR

ABSTRACT

Growth of the foodborne pathogen *Staphylococcus aureus* can be inhibited in milk and in cheese by the hydrogen peroxide-producing *Lactococcus garvieae* N201 dairy strain. Transcriptomic responses of two *S. aureus* strains, the *S. aureus* SA15 dairy strain and the MW2 human pathogenic strain, to this growth inhibition were investigated in Brain-Heart Infusion broth under a high or a low aeration level. We demonstrated that *S. aureus* MW2 had a higher resistance to *L. garvieae* inhibition under the high aeration level: this correlated to a higher survival under hydrogen peroxide exposure. Conversely, the two strains were similarly inhibited under the low aeration level. Expression of *S. aureus* genes involved in response to H₂O₂ or other stresses as well as in cell division was generally repressed by *L. garvieae*. However, differential expressions between the two *S. aureus* strains were observed, especially under the high aeration level. Additionally, expression of virulence-related genes (enterotoxins, regulatory genes) was modulated by *L. garvieae* depending on the aeration level and on the *S. aureus* strain. This study led to new insights into potential molecular mechanisms of *S. aureus* inhibition by Lactic Acid Bacteria via H₂O₂ production.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Staphylococcus aureus is responsible for food poisoning through the production of enterotoxins (De Buyser et al., 2001; Simeão do Carmo et al., 2002). In cheese, the European legislation established the obligation to evaluate the presence of enterotoxins when *S. aureus* level exceeds 10⁵ CFU g⁻¹ (European Community Regulation No. 852-853/2004). Lactic-Acid Bacteria (LAB) can affect the development and the virulence of *S. aureus* in cheeses by modulating the redox potential, the pH or through the production of inhibitory molecules, e.g. hydrogen peroxide (Alomar et al., 2008a; Cretenet et al., 2011; Nouaille et al., 2014).

Among these LAB, *Lactococcus garvieae*, commonly found in dairy products, can inhibit *S. aureus* growth in broth, milk, and cheese made from raw or pasteurized milk (Alomar et al., 2008a,

2008b; Delbes-Paus et al., 2010). This inhibition is neither associated with acidification nor with competition for amino-acids in micro-filtered milk (Alomar et al., 2008b). The role of hydrogen peroxide (or derivatives) produced by *L. garvieae* under aeration has been demonstrated *in vitro* (Delbes-Paus et al., 2010). By contrast, little is known about *S. aureus* response mechanisms to interaction with *L. garvieae*.

The expression of several *S. aureus* stress-response genes is known to be variably modified by an anaerobic shift (Fuchs et al., 2007), by H₂O₂ presence (Deng et al., 2014) or by the presence of another LAB, *Lactococcus lactis* (Cretenet et al., 2011; Even et al., 2009). Among these genes, the catalase encoded by *kata* and to a lesser extent the peroxiredoxin encoded by *ahpC* and activated by AhpF are the major hydrogen peroxide degradation enzymes (Cosgrove et al., 2007; Mandell, 1975). Additionally, protection against hydroxyl-radicals generated by H₂O₂ metabolism is managed by superoxide dismutase (SOD) encoded by *sodA* (Karavolos et al., 2003; Mandell, 1975). Consistently, *sodA*, *kata* and *ahpC* could be crucial for *S. aureus* growth and survival in the presence of hydroxyl-radicals under aerated conditions (Cosgrove et al., 2007; Maalej et al., 2006) or after a stress induction

* Corresponding author. Tel.: +33471456419.

E-mail addresses: pierre.delpech@clermont.inra.fr (P. Delpech), celine.delbes@clermont.inra.fr (C. Delbès).

¹ Present address: HORIBA ABX SAS, Parc Euromédecine, Rue du Caducée, BP 7290, 34184 Montpellier Cedex 4, France.

(Clements et al., 1999). Moreover, the ubiquitous chaperone-encoding *dnaK* and the protease-encoding *clpC* genes (both part of the CtsR regulon) are clearly related to *S. aureus* growth in various stress conditions and especially hydrogen peroxide stress (Chatterjee et al., 2005; Krüger et al., 1994; Singh et al., 2007). These stress-response genes, and especially H_2O_2 -response genes, may also be involved in *S. aureus* transcriptomic response to inhibition by *L. garvieae*.

In addition, several cell-division genes belonging to the division cell wall (*dcw*) cluster are downregulated by the presence of *L. lactis* (Cretenet et al., 2011; Even et al., 2009). This cluster is conserved in prokaryotes and essential for growth in *Escherichia coli* (Vicente et al., 1998). Thus the *S. aureus* growth inhibition by *L. garvieae* may be associated with a reduction of *dcw* cluster expression.

While *L. garvieae* has primarily been evaluated as a potential antagonist of *S. aureus* growth in food, the impact of inhibitory conditions on *S. aureus* virulence modulation is still unknown. Interestingly, *L. lactis* modifies the expression of several *S. aureus* virulence-related genes in cheese (Cretenet et al., 2011) or fermenters (Even et al., 2009; Nouaille et al., 2014). Among them, the *agr* system (*agrA/RNAIL* and *hld/RNAIL*), a major staphylococcal regulator of virulence (Abdelnour et al., 1993; Janzon et al., 1989), and the *codY* gene involved in virulence and adaptation to nutrient availability (Majerczyk et al., 2010; Molle et al., 2003) are repressed by *L. lactis*. In addition, *CodY* regulon is affected by H_2O_2 (Fuchs et al., 2013). The genes (*saeR*, *saeS*, *srrA* and *srrB*) encoding the SaeSR and SrrAB two-component systems (TCS), involved in virulence, physiology and environment adaptation (Liang et al., 2006; Novick and Jiang, 2003; Pragman et al., 2007; Throup et al., 2001), are variably affected by *L. lactis* (Even et al., 2009), by an aeration shift (Fuchs et al., 2007) or by H_2O_2 (Chang et al., 2006). *S. aureus* MW2 *sec4* (enterotoxin C) expression, controlled by *agrA/RNAIL* (Regassa and Betley, 1992), and *sel2* (enterotoxin L) expression are modified by *L. lactis* (Cretenet et al., 2011; Even et al., 2009).

To better understand and characterize the mechanisms of *S. aureus* growth inhibition in the presence of *L. garvieae*, we characterized the response of two *S. aureus* strains to *L. garvieae* *in vitro*, i.e. the SA15 dairy strain and the MW2 pathogenic human strain (Baba et al., 2002). Based on the literature data reported above and on preliminary results, we selected fifteen *S. aureus* genes known to be regulated by H_2O_2 , aeration level or by *L. lactis* and potentially involved in *S. aureus* response to *L. garvieae* inhibition. Indeed, we determined the expression variations of three H_2O_2 -response genes (*ahpF*, *katA* and *sodA*), three stress-response genes (*clpC*, *ctsR* and *dnaK*), two cell-division genes (*mraW* and *mraZ*), five regulators and virulence-related genes (*agrA/RNAIL*, *codY*, *hld/RNAIL*, *saeS* and *srrA*) and two enterotoxin-encoding genes (*sec4* and *sel2*) and investigated their relation with growth inhibition. To our knowledge, this is the first transcriptomic study concerning *S. aureus* response in co-culture with an H_2O_2 -producing LAB.

2. Materials and methods

2.1. Strains and culture conditions

L. garvieae N201 and *S. aureus* SA15, both isolated from raw milk, were obtained from the INRA UR545 collection (Alomar et al., 2008a). Human pathogenic *S. aureus* MW2 strain (RefSeq: NC_003923.1) was kindly provided by S. Even (UMR1253 STLO, INRA). *L. garvieae* was grown at 30 °C in a M17 broth (Biokar Diagnostic, Pantin, France) and both *S. aureus* strains were grown at 37 °C in Brain-Heart Infusion ("BHI", Biokar). All strains were grown for 20 h under aerobic conditions. The cultures were then centrifuged at 3500 × g for 15 min at 4 °C (Sigma 3MK, Bioblock Scientific,

Illkirch, France) and cell pellets were resuspended in BHI to obtain a 10X-concentration. The strains were then inoculated separately or co-inoculated at 10^6 CFU mL⁻¹ for *S. aureus* or 10^7 CFU mL⁻¹ for *L. garvieae* in 50-mL portions of BHI buffered at pH 7 with phosphate buffer KH_2PO_4 , $3H_2O/K_2HPO_4$ (KH_2PO_4 , $3H_2O$, Riedel-de-Haen, Honeywell GmbH, Seelze, Germany; K_2HPO_4 , Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and previously equilibrated at 30 °C.

Pure cultures and co-cultures were incubated either under a high or a low aeration level. For the high aeration level, mechanical shaking at 150 rpm was applied to the 50-mL cultures in 250-mL erlenmeyers. For the low aeration level, fully filled and sealed 50-mL Nunc EZ Flip conical centrifuge tubes (Sigma–Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) were incubated statically. Catalase (Sigma–Aldrich, ref C100-500MG) was added in culture broth at 400 U mL⁻¹ when specified. All cultures were incubated at 30 °C in an Infors HT Minitron (Infors AG, Bottmingen, Switzerland). After 0 h, 3 h, 6 h, 9 h and 24 h of incubation, 40 mL of each culture were centrifuged at 9600 × g for 10 min at 4 °C. The supernatants were stored on ice until determination of hydrogen peroxide concentration and pH measurement while the cell pellets were immediately frozen in an ethanol bath and stored at –80 °C until gene expression analyses by RT-qPCR. The remaining 10 mL of each culture was stored on ice until microbial count determination. The complete experimental design was repeated independently at least three times for each culture condition.

2.2. Determination of *S. aureus* sensitivity to hydrogen peroxide exposure

Both *S. aureus* SA15 and MW2 strains were grown under the high aeration level (shaken at 150 rpm) at 30 °C in BHI until a $OD_{600} = 0.1$. Hydrogen peroxide (Sigma–Aldrich) was then added at the final concentration of 0.5 mM, 1 mM, 2 mM or 4 mM and its concentration after 0 min, 30 min, 60 min, 90 min and 120 min of incubation was determined. Cultivable cells after 0 min and 120 min of incubation were counted as described below. Cultivable cell loss for each condition was determined by subtracting the final cellular concentration of a culture with H_2O_2 addition to the final cellular concentration of a control culture without any H_2O_2 addition. The complete experimental design was repeated independently three times.

2.3. Analytical methods

A Stomacher Laboratory Blender (Interscience, St. Nom la Bretèche, France) was used (4 min) to separate cellular aggregates in culture samples. The cellular concentrations were determined by plating and counting on Baird-Parker-agar supplemented with Rabbit Plasma Fibrogen (Biokar) for *S. aureus* and on BHI supplemented with 1.5% agar for *L. garvieae*. In co-cultures, the *L. garvieae* colonies were differentiated by their shape, size, color and number (the number of *L. garvieae* colonies was always at least 10 times higher than the number of *S. aureus* colonies).

Hydrogen peroxide concentrations during cell growth in buffered BHI were determined as described by Delbes-Paus et al. (2010). Briefly, we mixed 100 µL of culture supernatant with 750 µL of phosphate buffer Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 (0.1 M, Sigma), 100 µL of 4-aminoantipyrin solution (4 mg mL⁻¹, Sigma), 20 µL of water-saturated phenol (MP Biomedicals LLC, Santa Ana, California, USA) and 30 µL of peroxidase type VI-A from horseradish (~1000 U mL⁻¹ solution in sodium phosphate buffer at pH 6, Sigma). Hydrogen peroxide concentration of the solution was determined by comparing the solution absorbance at 505 nm to a standard curve performed with H_2O_2 solutions (Sigma) ranging from 0.5 mM to 5 mM in BHI.

2.4. Determination of *S. aureus* gene expression by RT-qPCR

After storage at -80°C , frozen cell pellets obtained from cultures at 6 h and 9 h were suspended in 500 μL of cold Tris–EDTA buffer. Then, 25 μL of 20% SDS, 500 μL of phenol at pH 4, 3.5 μL of β -mercaptoethanol, and 600 mg of Zirconium beads were added. The solution was milled in a Retsch MM200 mixer mill (VERDER Group, Haan, Germany) at 30 Hz for two 2-min runs with 2-min cooling on ice in between. Next, 200 μL of chloroform were added. The solution was gently hand-mixed and centrifuged at $13,000\times g$ for 20 min at 4°C . Extraction of RNAs was then performed on the aqueous and translucent phase using NucleoSpin RNA-L or RNA-II kit (Macherey–Nagel, GmbH & Co. KG, Düren, Germany) following the suppliers instructions. Then we treated RNA extracts with rDNase I using an Ambion DNA-free™ Kit (Ambion, Inc., Austin, Texas, USA) following the suppliers instructions. Absence of residual DNA was confirmed by qPCR with *S. aureus gyrB* reference gene primers (Table 1). If needed, rDNase I treatment was repeated until Cycle threshold (Ct) were >30 . The RNA extracts were quantified using a Nanodrop™ 2000C (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA). Adjusted quantities of RNAs (162 ng and 335 ng for the culture samples after 6 h or 9 h,

contained positive controls (genomic DNA of *S. aureus* SA15 and MW2) and negative controls (genomic DNA of *L. garvieae* N201 and ultra-pure water). Each sample reaction was repeated at least twice. Primer efficiency were determined according to a 10-fold template dilution standard and were all between 1.90 ($\sim 95\%$) and 2.14 ($\sim 107\%$) according to the equation: Efficiency = $10^{[-1/\text{slope of calibration curve}]}$ (Rasmussen, 2001). All R^2 calibration curve slopes were >0.99 . The primers targeting *ahpF*, *codY*, *mraZ*, *mraW* were designed using PrimerExpress® software (Applied Biosystems®, Life Technologies). Their analytical specificity was checked using BLASTn. Three reference genes were used together for the normalization of gene expressions (Table 1). They were housekeeping genes commonly used as reference genes in *S. aureus* (Duquenne et al., 2010; Sihto et al., 2014; Valihrach and Demnerova, 2012): *gyrB* encoding the DNA gyrase subunit B, *hu* encoding a DNA-binding protein and *recA* encoding the recombinase A. Their expression was stable in pure cultures under the different conditions at 6 h and 9 h but less stable at 24 h (data not shown). A gene of interest (“goi”) expression was calculated according to the formula introduced by Hellemans et al. (2007):

$$\text{Expression of goi} = \frac{(\text{goi efficiency})^{\Delta\text{Ct}_{\text{goi}}}}{\sqrt[3]{(\text{hu efficiency})^{\Delta\text{Ct}_{\text{hu}}} \times (\text{gyrB efficiency})^{\Delta\text{Ct}_{\text{gyrB}}} \times (\text{recA efficiency})^{\Delta\text{Ct}_{\text{recA}}}}$$

respectively) were retro-transcribed using a high capacity cDNA reverse transcription kit (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) following the supplier's instructions.

Genes of interest (Table 1) Ct were determined in qPCR assays using 2 μL cDNA suspensions which were 10 fold diluted in pure water and 18 μL qPCR mix containing 20 nmol of forward and reverse primers, 4 μL of pure water and 10 μL of SyBR Green PCR Mastermix (Applied Biotechnology, Life Technologies). qPCR reactions were performed using an ABI Prism 7000 qPCR system (Applied Biotechnology, Life Technologies) set at the following parameters: 50°C for 2 min, followed by 95°C for 10 min and 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. Each qPCR reaction

2.5. Comparison of gene expression and statistical analyses

Gene expression changes were evaluated by calculating the ratio of gene expression between two modalities of an experimental factor while other factors remained unchanged. The influence of two experimental factors was studied: the presence of *L. garvieae* (gene expression in pure culture compared to co-culture) and the aeration level (gene expression in high aeration level compared to low aeration level). Effect of aeration level on gene expressions was individually determined for each strain in pure culture. Effect of *L. garvieae* presence on *S. aureus* gene expressions was determined either under the high aeration level (shaking) or the low aeration

Table 1
Targeted *S. aureus* genes primers for qPCR analysis.

MW2 ORF	Gene ^a	Description	Forward primer	Reverse primer	References
MW0005	<i>gyrB</i> ^a	DNA gyrase	AATCAGCGTTAGATGTAGCAAGC	GTCACGACCAGATTTGTAGACC	(Cretenet et al., 2011)
MW1362	<i>hu</i> ^a	DNA-binding protein	TTTACGTGCAGCAGCTTCAC	AAAAAGAAGCTGGTTCAGCAGTAG	(Valihrach and Demnerova, 2012)
MW1168	<i>recA</i> ^a	Recombinase A	GGGAGACACTCAGTTGGTTTAC	AACITTTTTCACGAATTTGGTTGATG	(Valihrach and Demnerova, 2012)
MW1963	<i>agrA/RNAII</i>	Accessory gene regulator A	CCTCGCACCTGATAATCTTATG	ACGAATTTTCACTGCCTAATTTGA	(Cretenet et al., 2011)
MW0356	<i>ahpF</i>	Alkyl hydroperoxidase F	TGTGACGGACCTCTATTGA	CGCTAGCGAATTCGAATAAT	This study
MW0480	<i>clpC</i>	Clp proteinase C	AGTTATTCGAGGATGGACAGGTA	TTTGCCCAATAACTCTCTCATGT	(Cretenet et al., 2011)
MW0477	<i>ctsR</i>	Transcriptional repressor of stress-genes	CAGCIGATTGGACCTTCTATTTC	GCTTGAATCATTTTAGCTTCACG	(Cretenet et al., 2011)
MW1338	<i>codY</i>	Transcriptional repressor	AATCTTACGTGAGAAGCATAGTGAAGTAG	GCITTTATCGCGCGCTTCTT	This study
MW1532	<i>dnaK</i>	Chaperone protein DnaK	AAGGTTACAGTACAACACCATCT	GATTGAACAGTGTGGGTTTGT	(Cretenet et al., 2011)
MW1959	<i>hld/RNAIII</i>	Delta-hemolysin	TAAGGAAGGAGTGATTTCATG	GTGAATTTGTGACTGTGTCGAT	(Cretenet et al., 2011)
MW1221	<i>katA</i>	Catalase	ATTACGTATCATGATGGGTTTC	TTTCAATACCTTGTGCGTTCT	(Cretenet et al., 2011)
MW1062	<i>mraW</i>	S-adenosyl methyltransferase	GCGAGGAGAAAATTTCAAAACAG	CGCGATGTGCTTCGATTCIT	This study
MW1061	<i>mraZ</i>	Transcriptional regulator	ATGTCTCTCTGGTGTCTGTGAA	AATACGCCCTTGCTTATCAAGTTC	This study
MW0667	<i>saeS</i>	Histidine protein kinase	TCAATATTGCAACCATATGAGCA	AGTGGCGTTTCGATATTGATAAAA	(Cretenet et al., 2011)
MW0759	<i>sec4</i>	Enterotoxin C	AAACATGAAGGAAACCACTTTGA	TTTGCACTTCAAAAAGAAATTGTG	(Cretenet et al., 2011)
MW0760	<i>sel2</i>	Enterotoxin L	GGTTACCGCACAGAATAAGATG	TGCCGTATCTTTACCTTTACCA	(Cretenet et al., 2011)
MW1505	<i>sodA</i>	Superoxide dismutase	TTCTGGGAGTTACITTCACCAAA	CTGCTTTGTGACGAAATCTTTT	(Cretenet et al., 2011)
MW1446	<i>srrA</i>	Staphylococcal respiratory response	ATCTTTTGAAATCCATGAAGCAA	TCCATTTTCAGGCAACATTAAATC	(Cretenet et al., 2011)

^a Reference genes.

level (static). A gene was considered as upregulated or down-regulated when its expression was changed by at least a factor of two after an experimental factor modification (p -value < 0.1 or 0.05). Statistical analyses were performed using Statistica software (StatSoft, Inc., StatSoft France, Maisons-Alfort, France) by the analysis of one-factor variance (ANOVA) with a Newmann–Keuls post-hoc test.

3. Results

3.1. Growth inhibition of *S. aureus* by *L. garvieae* under high (shaking) or low (static) aeration level

Cultivable cell counts of *L. garvieae* N201, *S. aureus* SA15 and MW2 in pure culture or co-culture, under high or low aeration levels in BHI are shown in Table 2. pH values remained between 6.9 and 7.1 in all cultures (data not shown). *L. garvieae* growth was not affected by *S. aureus* regardless of the condition. In pure cultures under the high aeration level, *S. aureus* MW2 grew slightly more rapidly than *S. aureus* SA15, with a significant difference between the cell counts of the two strains at 3 h (5.7 log [CFU mL⁻¹] for *S. aureus* SA15 and 6.4 log [CFU mL⁻¹] for *S. aureus* MW2). Under the low aeration level in pure culture, the *S. aureus* MW2 cellular concentration was similar to the SA15 cellular concentration from 0 h to 24 h. Both *S. aureus* SA15 and MW2 growth was inhibited by *L. garvieae* under the two aeration levels.

Under the high aeration level, maximal inhibition was observed for the two strains after 9 h. *S. aureus* count in broth inoculated with *L. garvieae* was -5.2 ± 0.5 log (CFU mL⁻¹) lower for SA15 strain and -3.6 ± 0.3 log (CFU mL⁻¹) lower for MW2 strain than in the corresponding pure culture.

Under the low aeration level, *S. aureus* growth inhibition by *L. garvieae* was lower than that observed under the high aeration level. Maximal inhibition for the two strains was delayed at 24 h. *S. aureus* count in broth inoculated with *L. garvieae* was -3.7 ± 0.6 log (CFU mL⁻¹) lower for SA15 strain and -3.1 ± 0.3 log (CFU mL⁻¹) lower for MW2 strain than in the corresponding pure culture.

Inhibition was significantly higher (student test, p -value < 0.05) for *S. aureus* SA15 than for MW2 after 3 h, 6 h, and 9 h under the high aeration level. Under the low aeration level, inhibition did not differ significantly between the two strains.

3.2. Evolution of hydrogen peroxide concentration in *L. garvieae* and *S. aureus* pure cultures and co-cultures

In order to evaluate the potential role of hydrogen peroxide in

the observed inhibition, H₂O₂ concentration was measured in pure cultures of *L. garvieae* or *S. aureus* and in co-cultures after 3 h, 6 h, 9 h and 24 h of incubation under high (shaking) or low (static) aeration levels (Table 2). Hydrogen peroxide was detected only after 6 h under the high aeration level in cultures in which *L. garvieae* was present. Hydrogen peroxide concentration reached a peak at 9 h (~1.69 mM in *L. garvieae* pure culture) and then slightly decreased from 9 h to 24 h. In co-cultures, maximal concentrations of H₂O₂ at 9 h were ~1.64 mM of H₂O₂ in presence of *S. aureus* SA15 and ~1.40 mM in presence of *S. aureus* MW2. The higher the H₂O₂ concentration, the more important the growth inhibition of *S. aureus*. When catalase was added to *L. garvieae* N201 and *S. aureus* MW2 pure cultures and co-cultures under the high aeration level, no H₂O₂ was detected and *S. aureus* MW2 growth was not inhibited.

3.3. Survival of *S. aureus* to H₂O₂ exposure

To evaluate the capacity of *S. aureus* SA15 and MW2 strains to survive to H₂O₂ exposure, H₂O₂ was added at final concentrations of 0.5 mM–4 mM in *S. aureus* pure culture under the high aeration level and loss of *S. aureus* cultivable cells was then measured (Fig. 1). After 1 mM–4 mM of H₂O₂ initial spiking, *S. aureus* SA15 and MW2 cultivable cell counts were reduced in comparison to H₂O₂-free cultures. The *S. aureus* MW2 cultivable cell loss was 4.9 times lower after the addition of 1 mM of H₂O₂, 11.8 times lower after the addition of 2 mM of H₂O₂ and 10.6 times lower after the addition of 4 mM of H₂O₂ than the *S. aureus* SA15 cultivable cell loss under the same conditions. Concomitantly, H₂O₂ concentration rapidly decreased in all assays. Only 25% of initially added H₂O₂ was detected after 30 min in the presence of *S. aureus* SA15 or MW2 (data not shown). However, no significant difference in H₂O₂ concentration reduction was observed between the two strains over time regardless of the initial H₂O₂ concentration (data not shown).

3.4. Effect of aeration level on *S. aureus* gene expression in pure culture

Hydrogen peroxide was detected from 6 h under the high aeration level and its concentration reached a peak at 9 h when maximal *S. aureus* inhibition was observed. Therefore, 6 h and 9 h sampling time-points were considered of prime importance for gene expression comparative analyses by RT-qPCR. To further characterize the effect of aeration level (shaken condition versus static condition) on *S. aureus* at the transcriptomic level, the

Table 2

Growth and H₂O₂ concentration evolution over 24 h in pure cultures or co-cultures of *L. garvieae* N201 and *S. aureus* SA15 or MW2 under high (shaking) or low (static) aeration level.

			Time (h)					<i>L. garvieae</i> cellular concentration (log [CFU mL ⁻¹])					<i>S. aureus</i> cellular concentration (log [CFU mL ⁻¹])					Hydrogen peroxide concentration (mM)				
			0	3	6	9	24	0	3	6	9	24	0	3	6	9	24	0	3	6	9	24
High aeration level	Pure cultures	N201	7.0 ^a	7.8 ^a	8.4 ^a	8.7 ^a	8.9 ^a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.80 ^a	1.69 ^a	1.49 ^a
		SA15	ND	ND	ND	ND	ND	6.0 ^a	5.7 ^{a,b}	6.5 ^a	8.2 ^{a,b,c}	9.9 ^a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		MW2	ND	ND	ND	ND	ND	6.2 ^a	6.4 ^c	7.2 ^{a,b}	8.8 ^{a,c}	9.4 ^a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Co-cultures	N201 + SA15	7.0 ^a	7.8 ^a	8.4 ^a	8.9 ^a	9.0 ^a	6.0 ^a	4.7 ^d	4.2 ^c	3.0 ^d	5.1 ^b	ND	ND	ND	0.83 ^a	1.64 ^a	1.32 ^a				
		N201 + MW2	7.1 ^a	7.7 ^a	8.5 ^a	8.9 ^a	8.9 ^a	6.2 ^a	6.1 ^{a,c}	5.2 ^d	5.2 ^e	6.0 ^b	ND	ND	ND	0.76 ^a	1.40 ^a	1.01 ^a				
		SA15	ND	ND	ND	ND	ND	6.0 ^a	6.3 ^{a,c}	7.2 ^a	7.6 ^{a,b}	8.3 ^c	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Low aeration level	Pure cultures	MW2	ND	ND	ND	ND	ND	6.0 ^a	6.4 ^c	7.2 ^a	7.6 ^b	8.7 ^c	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		N201 + SA15	7.2 ^a	8.0 ^a	8.9 ^a	8.9 ^a	9.1 ^a	5.9 ^a	5.5 ^b	6.2 ^a	5.3 ^c	4.6 ^b	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		N201 + MW2	7.3 ^a	8.0 ^a	8.9 ^a	9.0 ^a	9.0 ^a	6.0 ^a	6.0 ^{a,c}	6.6 ^a	5.7 ^c	5.6 ^b	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Co-cultures	N201	7.2 ^a	NT	8.7 ^a	8.9 ^a	9.1 ^a	ND	NT	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		MW2	ND	NT	ND	ND	ND	6.3 ^a	NT	8.1 ^b	9.2 ^c	9.7 ^a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		N201 + MW2	7.1 ^a	NT	8.9 ^a	9.0 ^a	9.1 ^a	6.3 ^a	NT	7.9 ^b	8.9 ^c	9.6 ^a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

^{a,b,c,d,e} a same letter indicates values which are not significantly different (p -value < 0.05 by Newman–Keuls method) through one table column. ND = values below the detection limit (<1 log [CFU mL⁻¹] for the cell counts and <0.5 mM for hydrogen peroxide concentrations). NT = non-tested values.

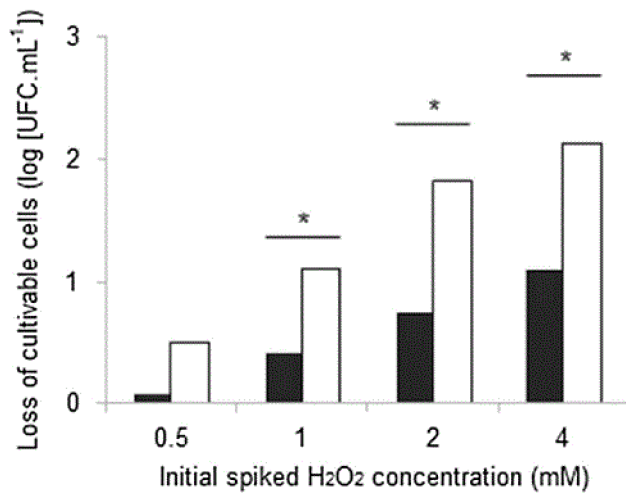


Fig. 1. Loss of *S. aureus* SA15 (empty bars) and MW2 (full bars) cultivable cells ^aunder H₂O₂-stress condition. [^adifference between the cellular concentration in culture with no H₂O₂ and cultures with H₂O₂ spiking (0.5, 1, 2 or 4 mM) after two hours of incubation. *significant difference between the two *S. aureus* strains (p-value < 0.05 according to Newman–Keuls test)].

expression of fifteen genes involved in cellular global regulations, H₂O₂ or stress-response, cell division and virulence was followed by RT-qPCR (Table 1). For most of these genes, expression was not or slightly affected by the aeration level in both *S. aureus* strains (Table 3).

In *S. aureus* SA15 at 9 h, *agr* system was slightly induced by the high aeration level, as much as the cell-division gene *mraZ*. Conversely, stress-response genes *clpC*, *ctsR* and *dnaK* were repressed at 9 h. For the other genes, expression was equivalent under both aeration levels.

Contrarily to *S. aureus* SA15 genes, no gene was induced in *S. aureus* MW2. However, stress-response genes *clpC*, *ctsR* and *dnaK* were similarly repressed by the high aeration level in both *S. aureus* strains at 9 h.

3.5. Effect of *L. garvieae* on *S. aureus* gene expression under the high aeration level

Among the fifteen tested genes, twelve genes were down-regulated by *L. garvieae* presence under the high aeration level at 6 h or 9 h in *S. aureus* SA15 or MW2 (Table 4). Four of these genes (*mraZ*, *mraW*, *srrA* and *saeS*) were significantly repressed in both *S. aureus* strains, while the eight others were repressed either in *S. aureus* SA15 or in *S. aureus* MW2.

In *S. aureus* SA15, *agr* system (here *agrA*/*RNAII* and *hld*/*RNAIII*), *saeS* and *srrA* regulatory genes and *mraZ* and *mraW* cell-division genes were repressed while *codY* was slightly induced, especially at 9 h. Among all tested genes, *mraW* was the most downregulated gene with an 18.7-time repression. The expression of catalase-encoding gene *kata* was 5.9 times repressed at 6 h and 6.3 times repressed at 9 h in *S. aureus* SA15. Similarly, *sodA* was 11.3 times repressed at 6 h and 9.9 times repressed at 9 h. Conversely, stress-response genes and enterotoxin-encoding genes expression remained stable. The expression levels of both *S. aureus* SA15 enterotoxins genes were very low compared to other genes (data not shown). Moreover, their expression in *S. aureus* SA15 was on average 35 times (*sec4*) and 29 times (*sel2*) lower than in *S. aureus* MW2 in all conditions.

In both *S. aureus* strains, regulatory genes *saeS* and *srrA* and cell-division genes *mraZ* and *mraW* were repressed at 9 h. However, *S. aureus* MW2 gene expression variations were generally different compared to *S. aureus* SA15. *agr* system was unaffected and *codY* repressed at 6 h. Stress-response genes *clpC*, *ctsR* and *dnaK* were slightly repressed at 9 h. The H₂O₂-response genes *kata* and *sodA* were not repressed in *S. aureus* MW2 and *ahpF* was even 5.8 times induced.

3.6. Effect of *L. garvieae* on *S. aureus* gene expression under the low aeration level

Under the low aeration level, expression of eleven *S. aureus* genes was repressed by *L. garvieae*, and most of gene expression variations occurred at 9 h (Table 5).

In *S. aureus* SA15, *saeS*, repressed at 9 h, was the only affected regulator. Stress response genes *clpC*, *ctsR* and *dnaK* were repressed at 9 h, as well as H₂O₂-response gene *sodA* and enterotoxin-encoding gene *sec4*. Cell-division genes *mraZ* and *mraW* were repressed only at 6 h.

In *S. aureus* MW2, comparable repressor effect was observed on *saeS*, *clpC*, *ctsR*, *dnaK*, *sodA* and *sec4* gene expression. Intriguingly, *S. aureus* MW2 *mraZ* and *mraW* genes were repressed only at 9 h whereas they were repressed only at 6 h in *S. aureus* SA15. *S. aureus* MW2 *agrA*/*RNAII* and *codY* regulatory genes and *sel2* enterotoxin-encoding gene were repressed while their expression remained stable in *S. aureus* SA15.

4. Discussion

In food matrices, biopreservation can be an alternative to additives for the control of pathogens. While the interest in *L. garvieae* (Alomar et al., 2008b; Delbes-Paus et al., 2010) and other H₂O₂-producing LAB (Adesokan et al., 2010; Batdorj et al., 2007; Charlier et al., 2009; Ito et al., 2003) for their biopreservative potential in

Table 3

Aeration-induced gene expression changes at 6 h and 9 h in *S. aureus* SA15 or MW2 pure cultures (ratio of gene expression under shaken condition versus under static condition) at 6 h and 9 h.

		Gene category	Regulators (virulence-related)		Stress-response			Cell division
			<i>agrA</i> / <i>RNAII</i>	<i>hld</i> / <i>RNAIII</i>	<i>clpC</i>	<i>ctsR</i>	<i>dnaK</i>	<i>mraZ</i>
Genes up-regulated by the high aeration level	6 h	SA15						
		MW2						
	9 h	SA15	2.5**	4.5**				2.2**
		MW2						
Genes down-regulated by the high aeration level	6 h	SA15					3.6**	
		MW2						
	9 h	SA15			4.1**	6.3**	2.5**	
		MW2			5.7**	3.4**	3.3**	

Genes were considered differentially expressed when the p-value was lower than 0.05 (**) according to the Newman–Keuls test, and simultaneously when the expression change was of at least 2 times.

Table 4

Genes expression modifications induced by *L. garvieae* under the high aeration level at 6 h and 9 h in *S. aureus* SA15 or MW2 (ratio of gene expression in co-culture versus pure culture).

	Gene category	Gene	Regulators (virulence-related)					Stress-response			H ₂ O ₂ -response			Cell division		Enterotoxins	
			<i>agrA/RNAII</i>	<i>hld/RNAIII</i>	<i>codY</i>	<i>saeS</i>	<i>srrA</i>	<i>clpC</i>	<i>ctsR</i>	<i>dnaK</i>	<i>katA</i>	<i>sodA</i>	<i>ahpF</i>	<i>mraZ</i>	<i>mraW</i>	<i>sec4</i>	<i>sel2</i>
Genes up-regulated by <i>L. garvieae</i>	6 h	SA15															
		MW2											5.8**				
Genes downregulated by <i>L. garvieae</i>	9 h	SA15			2.0**												
		MW2														3.3**	7.1**
Genes downregulated by <i>L. garvieae</i>	6 h	SA15		2.6**			2.5**				5.9**	11.3**				8.2*	
		MW2			4.7**	5.1*			3.7**					12.2**		6.2*	
	9 h	SA15	2.2**	3.7**		4.5**	5.0**				6.3**	9.9**		6.1**		18.7**	
		MW2				11.1*	6.8**	2.5**	3.0**	3.4*				13.1*	14.5*		

Genes were considered differentially expressed when the p-value was lower than 0.1 (*) or 0.05 (**) according to the Newman–Keuls test, and simultaneously when the expression change was of at least 2 times.

dairy and other food products is growing, little is known about the underlying molecular mechanisms involved in the control of *S. aureus* or other pathogens growth. Understanding the bio-preservative mechanisms is therefore needed to promote this approach. This study aimed to better understand the molecular mechanisms of *S. aureus* growth inhibition by H₂O₂-producing *L. garvieae* through the characterization and the comparison of the transcriptomic response of two different *S. aureus* strains. To our knowledge, this is the first study investigating the *S. aureus* transcriptomic changes associated with its inhibition by *L. garvieae*.

The suppression of growth inhibition when catalase was added confirmed the important role of H₂O₂ in *S. aureus* MW2 growth inhibition, as it has been shown for *S. aureus* SA15 (Delbes-Paus et al., 2010). *S. aureus* MW2 pathogenic strain was less inhibited than *S. aureus* SA15 dairy strain by *L. garvieae* under the high aeration level. This difference was not explained by different H₂O₂-scavenging capacities but was rather associated with the higher capacity of *S. aureus* MW2 to manage and control stress induced by hydrogen peroxide. Indeed, during the exponential growth phase, *S. aureus* MW2 survived to a higher degree than *S. aureus* SA15 to H₂O₂ exposure in highly aerated pure cultures. The repression of *S. aureus* SA15 *katA* and *sodA* H₂O₂-response genes by *L. garvieae* under the high aeration level would likely diminish the capacities of this strain to manage H₂O₂ stress. In the same conditions, the overexpression of *S. aureus* MW2 *ahpF* likely enhanced its capacities to manage H₂O₂ stress compared to SA15 strain. It has already been observed that growth of a *S. aureus* Δ *katA* mutant or Δ *katA* Δ *ahpC* double-mutant is impaired under aeration and in the presence of hydroxyl-radicals (Cosgrove et al., 2007; Maalej et al., 2006). Moreover, a *S. aureus* Δ *sodA* mutant growth is inhibited after a stress induction (Clements et al., 1999). Thus, growth inhibition differences between *S. aureus* SA15 and MW2 were consistent with H₂O₂-response transcriptional differences, suggesting an

important role of *katA*, *sodA* and *ahpF* in *S. aureus* response to inhibition by *L. garvieae*. The repressor effect of *L. garvieae* on expression of genes involved in H₂O₂ response was more pronounced under the high aeration level than under the low aeration level (Tables 4 and 5, p-value < 0.05), consistently with the presumed foremost role of H₂O₂ in *S. aureus* growth inhibition.

To enlarge our investigations to general stress-response mechanisms, we analyzed the expression of three *ctsR* regulon genes: *ctsR*, *clpC* and *dnaK*. It is known that expression of *clpC* and *ctsR* in *S. aureus* MW2 can be repressed by *L. lactis* (Even et al., 2009). Consistently in *S. aureus* MW2, these three genes were repressed by *L. garvieae* under both aeration levels. A strong growth impairment of *S. aureus* *clpC* or *dnaK* mutants has already been shown in the presence of various stresses, such as H₂O₂ presence (Chatterjee et al., 2005; Krüger et al., 1994; Singh et al., 2007). Therefore, repression of *clpC*, *ctsR* and *dnaK* by *L. garvieae*, was likely more detrimental to *S. aureus* growth under the high aeration level (when H₂O₂ was present) than under the low aeration level.

Additionally, we observed a general repression of *S. aureus* cell-division genes *mraZ* and *mraW* by *L. garvieae* under both aeration levels. These genes belong to the cell-division conserved *dcw* cluster (Vicente et al., 1998). Among genes regulated by the transcriptional regulator *mraZ* (Eraso et al., 2014) or co-transcribed with *mraZ* and *mraW* in *E. coli* (Hara et al., 1997), some of them (for e.g. *ftsW*, *ftsI*, *ftsL*) are essential genes involved in septum formation. Thus, the repression of *mraZ* and *mraW* could also be involved in the *S. aureus* growth delay in the presence of *L. garvieae*. Supporting this observation, a low expression level of three other *dcw* cluster genes of *S. aureus* MW2 (*ftsZ*, *ftsI* and *ftsH*) has previously been observed in the presence of inhibitory *L. lactis* in cheese or in a fermenter (Cretenet et al., 2011; Even et al., 2009).

The control of *S. aureus* virulence in food, in particular when associated with enterotoxin production, is as relevant as its growth

Table 5

Genes expression modifications induced by *L. garvieae* under the low aeration level at 6 h and 9 h in *S. aureus* SA15 or MW2 (ratio of gene expression in co-culture versus pure culture).

	Gene category	Gene	Regulators (virulence-related)				Stress-response			H ₂ O ₂ -response		Cell division		Enterotoxins	
			<i>agrA/RNAII</i>	<i>codY</i>	<i>saeS</i>		<i>clpC</i>	<i>ctsR</i>	<i>dnaK</i>	<i>sodA</i>	<i>ahpF</i>	<i>mraZ</i>	<i>mraW</i>	<i>sec4</i>	<i>sel2</i>
Genes up-regulated by <i>L. garvieae</i>	6 h	SA15									2.2*				4.1*
		MW2													
Genes downregulated by <i>L. garvieae</i>	9 h	SA15													
		MW2													
Genes downregulated by <i>L. garvieae</i>	6 h	SA15							2.8**			8.5*	4.0**		
		MW2													
	9 h	SA15			3.5**		2.6**	5.0**	5.2**	6.9**				2.0**	
		MW2	2.9*	4.9**	4.4**		13.0**	11.3**	10.9**	3.5**		11.8**	3.8**	5.6*	3.2*

Genes were considered differentially expressed when the p-value was lower than 0.1 (*) or 0.05 (**) according to the Newman–Keuls test, and simultaneously when the expression change was of at least 2 times.

control. Indeed, the production of enterotoxins by *S. aureus* is the predominant cause of food poisoning outbreaks and thus one of the most important virulence-related properties of *S. aureus* (Le Loir et al., 2003). Therefore we investigated whether the *S. aureus* growth inhibition by *L. garvieae* was associated with the modulation of its virulence. In *S. aureus*, virulence factors are controlled by the *agr* system (Queck et al., 2008). Depending on the culture conditions, the *agr* system can be under the control of the *CodY* transcriptional repressor (Majerczyk et al., 2008), the *SaeSR* or *SrrAB* TCS (Liang et al., 2006; Yarwood et al., 2001). The expression of *codY*, *saeS* and *srrA* were variously affected by *L. garvieae* and by the aeration level, suggesting a modulation of *S. aureus* virulence by these factors. Interestingly, expression changes of all tested virulence-related genes were different between the two *S. aureus* strains (for e.g. *agr* system was repressed under the high aeration level in *S. aureus* SA15 while it was repressed under the low aeration level in *S. aureus* MW2). This may reveal differences in their virulence potential. *sec4* and *sel2* were the only two enterotoxin-encoding genes identified in both *S. aureus* SA15 and MW2 genomes (data not shown). Both genes were poorly expressed in the dairy strain SA15 compared with the human pathogenic strain MW2. It has been demonstrated that expression of the gene encoding the enterotoxin C (*sec4*) can be positively associated with *agrA/RNall* and *hld/RNalll* transcription in *S. aureus* MW2 (Queck et al., 2008). This was consistent with the concomitant variations of *sec4* and *agrA/RNall* expression observed in co-cultures under the low aeration level. In this condition, *L. garvieae* repressed both *S. aureus* MW2 *sec4* and *sel2* (and *S. aureus* SA15 *sec4*) gene expressions at 9 h. This was consistent with the non-detection of enterotoxins A to E up to 24 h previously observed by Alomar et al. (2008a) under similar conditions.

This study provides new insights in microbial interaction mechanisms potentially related to biopreservation by suggesting at least three pathways which may act synergistically to explain the *S. aureus* growth inhibition by *L. garvieae*. Firstly, reduction of *S. aureus* H₂O₂-scavenging and H₂O₂-stress management capacities would likely have a negative impact on growth in the presence of H₂O₂ produced by *L. garvieae*. Secondly, cell division genes repression could be detrimental to *S. aureus* growth whatever the aeration level. Thirdly, reduction of stress-response gene expression by *L. garvieae* could be responsible for a lower stress resistance and have a negative effect on growth especially in presence of H₂O₂. For a better understanding of the molecular mechanisms involved in or affected by this inhibition, the global transcriptomic response of the two partners should be studied. The anti-staphylococcal properties of *L. garvieae* N201 against the SA15 dairy strain, against wild *S. aureus* populations in raw milk cheese (Delbes-Paus et al., 2010) as well as against the MW2 human pathogenic strain suggested that this LAB strain may be efficient to control a panel of *S. aureus* strains. The repression of *S. aureus* enterotoxin-encoding genes by *L. garvieae* is of particular interest for food preservation. Also, the control of this repression, as well as the importance of the three proposed pathways in *S. aureus* response to inhibition by *L. garvieae* should be further evaluated in complex food matrices.

Acknowledgments

The authors would like to thank Etienne Rifa for his help in bioinformatics for qPCR data analyses, Cécile Moussard for H₂O₂-detection method optimization, Magali Cordaillat-Simmons, Adrien Nivoliez, David Tropel, Laurent Rios, Monique Zagorec, Yves Le Loir, Pierre Renault and Hélène Falentin for their helpful advices and Joseph Simmons for English proofreading. Pierre Delpech was the recipient of a PhD fellowship from the FEDER (Fond Européen de Développement Economique et Régional) and the

Auvergne region with the support of the Pharmabiotic Research Institute (PRI) cluster. This research received partial funding from the ANR (Agence Nationale de la Recherche, ANR-08-ALIA-011 NABAB project).

References

- Abdelnour, A., Arvidson, S., Bremell, T., Rydén, C., Tarkowski, A., 1993. The accessory gene regulator (*agr*) controls *Staphylococcus aureus* virulence in a murine arthritis model. *Infect. Immun.* 61, 3879–3885.
- Adesokan, I.A., Ekanola, Y.A., Okanlawon, B.M., 2010. Influence of cultural conditions on hydrogen peroxide production by lactic acid bacteria isolated from some Nigerian traditional fermented foods. *Afr. J. Microbiol. Res.* 4, 1991–1996.
- Alomar, J., Lebert, A., Montel, M.C., 2008a. Effect of temperature and pH on growth of *Staphylococcus aureus* in co-culture with *Lactococcus garvieae*. *Curr. Microbiol.* 56, 408–412.
- Alomar, J., Loubiere, P., Delbes, C., Nouaille, S., Montel, M.C., 2008b. Effect of *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecalis* on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in microfiltered milk. *Food Microbiol.* 25, 502–508.
- Baba, T., Takeuchi, F., Kuroda, M., Yuzawa, H., Aoki, K., Oguchi, A., Nagai, Y., Iwama, N., Asano, K., Naimi, T., Kuroda, H., Cui, L., Yamamoto, K., Hiramatsu, K., 2002. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet* 359, 1819–1827.
- Batdorj, B., Trinetta, V., Dalgalarrodo, M., Prévost, H., Dousset, X., Ivanova, I., Haertlé, T., Chobert, J.-M., 2007. Isolation, taxonomic identification and hydrogen peroxide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* T31, isolated from Mongolian yoghurt: inhibitory activity on food-borne pathogens. *J. Appl. Microbiol.* 103, 584–593.
- De Buyser, M.L., Dufour, B., Maire, M., Lafarge, V., 2001. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *Int. J. Food Microbiol.* 67, 1–17.
- Chang, W., Small, D.A., Toghiani, F., Bentley, W.E., 2006. Global transcriptome analysis of *Staphylococcus aureus* response to hydrogen peroxide. *J. Bacteriol.* 188, 1648–1659.
- Charlier, C., Cretenet, M., Even, S., Le Loir, Y., 2009. Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: an old story with new perspectives. *Int. J. Food Microbiol.* 131, 30–39.
- Chatterjee, I., Becker, P., Grundmeier, M., Bischoff, M., Somerville, G.A., Peters, G., Sinha, B., Harraghy, N., Proctor, R.A., Herrmann, M., 2005. *Staphylococcus aureus* ClpC is required for stress resistance, aconitase activity, growth recovery, and death. *J. Bacteriol.* 187, 4488–4496.
- Clements, M.O., Watson, S.P., Foster, S.J., 1999. Characterization of the major superoxide dismutase of *Staphylococcus aureus* and its role in starvation survival, stress resistance, and pathogenicity. *J. Bacteriol.* 181, 3898–3903.
- Cosgrove, K., Coutts, G., Jonsson, I.-M., Tarkowski, A., Kokai-Kun, J.F., Mond, J.J., Foster, S.J., 2007. Catalase (KatA) and Alkyl Hydroperoxide Reductase (AhpC) have compensatory roles in peroxide stress resistance and are required for survival, persistence, and nasal colonization in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 189, 1025–1035.
- Cretenet, M., Nouaille, S., Thouin, J., Rault, L., Stenz, L., François, P., Hennekinne, J.-A., Piot, M., Maillard, M.B., Fauquant, J., Loubiere, P., Le Loir, Y., Even, S., 2011. *Staphylococcus aureus* virulence and metabolism are dramatically affected by *Lactococcus lactis* in cheese matrix. *Environ. Microbiol. Rep.* 3, 340–351.
- Delbes-Paus, C., Dorchies, G., Chaabna, Z., Callon, C., Montel, M.-C., 2010. Contribution of hydrogen peroxide to the inhibition of *Staphylococcus aureus* by *Lactococcus garvieae* in interaction with raw milk microbial community. *Food Microbiol.* 27, 924–932.
- Deng, X., Liang, H., Ulanovskaya, O.A., Ji, Q., Zhou, T., Sun, F., Lu, Z., Hutchison, A.L., Lan, L., Wu, M., Cravatt, B., He, C., 2014. Steady-state hydrogen peroxide induces glycolysis in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 196, 2499–2513.
- Duquenne, M., Fleuret, L., Aigle, M., Darrigo, C., Borezé-Durant, E., Derzelle, S., Bouix, M., Deperrois-Lafarge, V., Delacroix-Buchet, A., 2010. Tool for quantification of staphylococcal enterotoxin gene expression in cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1367–1374.
- Eraso, J.M., Markillie, L.M., Mitchell, H.D., Taylor, R.C., Orr, G., Margolin, W., 2014. The highly conserved MraZ protein is a transcriptional regulator in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 196, 2053–2066.
- Even, S., Charlier, C., Nouaille, S., Ben Zakour, N.L., Cretenet, M., Cousin, F.J., Gautier, M., Coccagn-Bousquet, M., Loubiere, P., Le Loir, Y., 2009. *Staphylococcus aureus* virulence expression is impaired by *Lactococcus lactis* in mixed cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 4459–4472.
- Fuchs, S., Pane-Farre, J., Kohler, C., Hecker, M., Engelmann, S., 2007. Anaerobic gene expression in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 189, 4275–4289.
- Fuchs, S., Zühlke, D., Pané-Farré, J., Kusch, H., Wolf, C., Reif, S., Binh, L.T.N., Albrecht, D., Riedel, K., Hecker, M., Engelmann, S., 2013. Aureolib – a proteome signature library: towards an understanding of *staphylococcus aureus* pathophysiology. *PLoS One* 8, e70669.
- Hara, H., Yasuda, S., Horiuchi, K., Park, J.T., 1997. A promoter for the first nine genes of the *Escherichia coli* mra cluster of cell division and cell envelope biosynthesis genes, including *ftsI* and *ftsW*. *J. Bacteriol.* 179, 5802–5811.
- Hellemans, J., Mortier, G., Paeppe, A.D., Speleman, F., Vandesompele, J., 2007. qBase

- relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 8, R19.
- Ito, A., Sato, Y., Kudo, S., Sato, S., Nakajima, H., Toba, T., 2003. The Screening of hydrogen peroxide-producing lactic acid bacteria and their application to inactivating psychrotrophic food-borne pathogens. *Curr. Microbiol.* 47, 0231–0236.
- Janzon, L., Löfdahl, S., Arvidson, S., 1989. Identification and nucleotide sequence of the delta-lysin gene, *hld*, adjacent to the accessory gene regulator (*agr*) of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Gen. Genet.* 219, 480–485.
- Karavolos, M.H., Horsburgh, M.J., Ingham, E., Foster, S.J., 2003. Role and regulation of the superoxide dismutases of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Read. Engl.* 149, 2749–2758.
- Krüger, E., Völker, U., Hecker, M., 1994. Stress induction of *clpC* in *Bacillus subtilis* and its involvement in stress tolerance. *J. Bacteriol.* 176, 3360–3367.
- Liang, X., Yu, C., Sun, J., Liu, H., Landwehr, C., Holmes, D., Ji, Y., 2006. Inactivation of a two-component signal transduction system, *SaeRS*, eliminates adherence and attenuates virulence of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 74, 4655–4665.
- Le Loir, Y., Baron, F., Gautier, M., 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet. Mol. Res.* 2, 63–76.
- Maalej, S., Dammak, I., Dukan, S., 2006. The impairment of superoxide dismutase coordinates the derepression of the *PerR* regulon in the response of *Staphylococcus aureus* to H₂O₂ stress. *Microbiology* 152, 855–861.
- Majerczyk, C.D., Sadykov, M.R., Luong, T.T., Lee, C., Somerville, G.A., Sonenshein, A.L., 2008. *Staphylococcus aureus* *CodY* negatively regulates virulence gene expression. *J. Bacteriol.* 190, 2257–2265.
- Majerczyk, C.D., Dunman, P.M., Luong, T.T., Lee, C.Y., Sadykov, M.R., Somerville, G.A., Bodi, K., Sonenshein, A.L., 2010. Direct targets of *CodY* in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 192, 2861–2877.
- Mandell, G.L., 1975. Catalase, superoxide dismutase, and virulence of *Staphylococcus aureus*. In vitro and in vivo studies with emphasis on staphylococcal–leukocyte interaction. *J. Clin. Investig.* 55, 561–566.
- Molle, V., Nakaura, Y., Shivers, R.P., Yamaguchi, H., Losick, R., Fujita, Y., Sonenshein, A.L., 2003. Additional targets of the *Bacillus subtilis* global regulator *CodY* identified by chromatin immunoprecipitation and genome-wide transcript analysis. *J. Bacteriol.* 185, 1911–1922.
- Nouaille, S., Rault, L., Jeanson, S., Loubière, P., Loir, Y.L., Even, S., 2014. Contribution of *Lactococcus lactis* reducing properties to the downregulation of a major virulence regulator in *Staphylococcus aureus*, the *agr* system. *Appl. Environ. Microbiol.* 80 (22), 7028–7035.
- Novick, R.P., Jiang, D., 2003. The staphylococcal *saeRS* system coordinates environmental signals with *agr* quorum sensing. *Microbiology* 149, 2709–2717.
- Pragman, A.A., Herron-Olson, L., Case, L.C., Vetter, S.M., Henke, E.E., Kapur, V., Schlievert, P.M., 2007. Sequence analysis of the *Staphylococcus aureus* *srrAB* loci reveals that truncation of *srrA* affects growth and virulence factor expression. *J. Bacteriol.* 189, 7515–7519.
- Queck, S.Y., Jameson-Lee, M., Villaruz, A.E., Bach, T.-H.L., Khan, B.A., Sturdevant, D.E., Ricklefs, S.M., Li, M., Otto, M., 2008. RNAIII-independent target gene control by the *agr* Quorum-sensing system: insight into the evolution of virulence regulation in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Cell* 32, 150–158.
- Rasmussen, R., 2001. Quantification on the LightCycler. In: Meur, S., Wittwer, C., Nakagawara, K. (Eds.), *Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications*. Springer Press, Heidelberg, pp. 21–34.
- Regassa, L.B., Betley, M.J., 1992. Alkaline pH decreases expression of the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 174, 5095–5100.
- Sihto, H.-M., Tasara, T., Stephan, R., Johler, S., 2014. Validation of reference genes for normalization of qPCR mRNA expression levels in *Staphylococcus aureus* exposed to osmotic and lactic acid stress conditions encountered during food production and preservation. *FEMS Microbiol. Lett.* 356, 134–140.
- Simeão do Carmo, L., Dias, R.S., Linardi, V.R., José de Sena, M., Aparecida dos Santos, D., Eduardo de Faria, M., Pena, E.C., Jett, M., Heneine, L.G., 2002. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiol.* 19, 9–14.
- Singh, V.K., Utaida, S., Jackson, L.S., Jayaswal, R.K., Wilkinson, B.J., Chamberlain, N.R., 2007. Role for *dnaK* locus in tolerance of multiple stresses in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 153, 3162–3173.
- Throup, J.P., Zappacosta, F., Lunsford, R.D., Annan, R.S., Carr, S.A., Lonsdale, J.T., Bryant, A.P., McDevitt, D., Rosenberg, M., Burnham, M.K.R., 2001. The *srhSR* gene pair from *Staphylococcus aureus*: genomic and proteomic approaches to the identification and characterization of gene function. *Biochemistry* 40, 10392–10401. <http://dx.doi.org/10.1021/bi0102959>.
- Valihrach, L., Demnerova, K., 2012. Impact of normalization method on experimental outcome using RT-qPCR in *Staphylococcus aureus*. *J. Microbiol. Methods* 90, 214–216.
- Vicente, M., Gomez, M.J., Ayala, J.A., 1998. Regulation of transcription of cell division genes in the *Escherichia coli* *dcw* cluster. *Cell. Mol. Life Sci.* 54, 317–324.
- Yarwood, J.M., McCormick, J.K., Schlievert, P.M., 2001. Identification of a novel two-component regulatory system that acts in global regulation of virulence factors of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 183, 1113–1123.

Chapitre 3

Détermination des mécanismes de
L. garvieae N201 impliqués dans
l'antagonisme contre *S. aureus*

Chapitre 3

Détermination des mécanismes de *L. garvieae* N201 impliqués dans l'antagonisme contre *S. aureus*

Aujourd'hui, peu d'études ont exploré les mécanismes de *L. garvieae* dans le cadre d'antagonismes envers d'autres bactéries. Si le peroxyde d'hydrogène a été suggéré comme étant le composé inhibiteur de *S. aureus* principal produit par *L. garvieae* (Delbes-Paus et al., 2010), l'organisation et la modulation du métabolisme sous-jacent sont inconnues dans cette espèce. De plus, au moins un autre effecteur jouerait un rôle dans l'inhibition de *S. aureus*.

Afin de mieux caractériser les mécanismes inhibiteurs de *L. garvieae* N201 contre le développement de *S. aureus*, nous avons exploré la réponse de cette souche aux changements de niveau d'aération et à la présence de *S. aureus*. Premièrement, une approche génomique a permis d'identifier les gènes potentiellement impliqués dans les mécanismes inhibiteurs. La souche N201 étant une candidate intéressante comme agent de biopréservation, nous avons également recherché ses éventuels gènes de virulence. Deuxièmement, les variations transcriptomiques de cette souche ont été évaluées en réponse à un niveau d'oxygénation élevé ou faible et à la présence ou l'absence de *S. aureus*. Troisièmement, les mécanismes candidats pour expliquer l'inhibition suite à cette approche transcriptomique ont été évalués par une approche physiologique.

Certains résultats de l'approche génomique ont été présentés dans un « genome announcement », en attente de soumission. Les résultats de l'approche transcriptomique et physiologique font l'objet d'un article soumis pour publication dans Applied and Environmental Microbiology.

Article n°2 : Genome announcement, en attente de soumission :

« Genome sequence of *Lactococcus garvieae* N201 isolated from Saint-Nectaire cheese and showing anti-staphylococcal activities »

Stéphanie Bornes, Pierre Delpech, Etienne Rifa, Mathieu Almeida, Agnès Hébert, Anne-Laure Abraham, Valentin Loux, Françoise Irlinger, Marie-Christine Montel, Pierre Renault, Céline Delbès

Article n°3 : soumis dans Applied and Environmental Microbiology :

« New insights into the biopreservative potential of *Lactococcus garvieae* against *Staphylococcus aureus* using RNA sequencing profiling »

Pierre Delpech, Etienne Rifa, Sabine Nidelet, Emeric Dubois, Geneviève Gagne, Marie-Christine Montel, Céline Delbès, Stéphanie Bornes

PARTIE I : APPROCHE GENOMIQUE

I.1. Matériel et méthodes

La méthodologie relative à ce travail est disponible dans le chapitre IV.1. de la section « Méthodologie » du manuscrit ainsi que dans le genome announcement de Bornes et al., pas encore publié, disponible à la suite de cette partie.

I.2. Résultats

L'obtention du génome de *L. garvieae* N201 a permis d'établir une première liste des outils génomiques dont disposait la bactérie. Les données principales ont été présentées dans un « genome announcement » visible à la suite de cette partie. Les principaux résultats ainsi que des analyses complémentaires sont détaillés dans les paragraphes suivants.

Dans le cadre de l'étude de *L. garvieae* au niveau de ses mécanismes d'interaction avec *S. aureus* et de l'évaluation de son potentiel comme agent biopréservateur, nous avons donc répondu à deux problématiques principales. Premièrement, nous avons cherché à identifier les gènes de cette souche qui pouvaient être impliqués dans l'inhibition de croissance de *S. aureus*. Secondement, nous avons exploré le génome de *L. garvieae* N201 afin de distinguer de potentiels facteurs de virulence.

I.2.1. Identification de gènes potentiellement impliqués dans l'inhibition de *S. aureus*

L'analyse du génome de *L. garvieae* N201 par BLASTn nous a permis de valider la présence de gènes potentiellement impliqués dans l'inhibition de *S. aureus*. Ceux-ci sont présentés dans le tableau 18. Les voies métaboliques ciblées et la liste des gènes recherchés ont été établies à partir de la synthèse bibliographique présentée précédemment.

Tableau 18. Gènes potentiellement impliqués dans l'inhibition de *S. aureus* identifiés dans la souche *L. garvieae* N201. Les gènes ont été identifiés par BLASTn.

Fonction	Catégorie de gènes	Nombre de gènes	Dénomination ^a
Synthèse du H₂O₂	pyruvate oxydase	1	<i>pox</i>
	<i>sodA</i>	1	<i>sodA</i>
Dégradation du H₂O₂	alkyl hydroperoxydase	2	<i>ahpC</i> , <i>ahpF</i>
	thiorédoxine	2	<i>trxA1</i> et <i>trxA2</i>
	thiorédoxine réductase	2	<i>trxB1</i> et <i>trxB2</i>
	glutarédoxine	0	
	glutathion réductase	1	<i>gshR</i>
	glutathion peroxydase	1	<i>gpx</i> ou <i>gpo</i>
Dégradation des autres peroxydes	famille <i>osmC</i> / <i>ohr</i>	2	<i>ohrA</i> et <i>ohrR</i>
Consommation du O₂	NADH déshydrogénase	2	<i>noxA</i> , <i>noxB</i>
	NADH oxydase	1	<i>noxE</i>
	lactate monooxygénase / oxydase	1	<i>lox</i> ou <i>lctO</i>
Régulateurs de la réponse au stress	<i>hrcA</i>	1	<i>hrcA</i>
	gène codant le facteur sigma B	1	<i>rpoB</i>
	<i>ctsR</i>	1	<i>ctsR</i>
Chaperonnes	<i>groES</i>	1	<i>groES</i>
	<i>groEL</i>	1	<i>groEL</i>
	<i>dnaK</i>	1	<i>dnaK</i>
	<i>dnaJ</i>	1	<i>dnaJ</i>
	<i>grpE</i>	1	<i>grpE</i>
	<i>ybeY</i>	1	<i>ybeY</i>
	<i>codY</i>	1	<i>codY</i>
ATPases et protéases de type Clp	<i>clpB</i>	1	<i>clpB</i>
	<i>clpC</i>	1	<i>clpC</i>
	<i>clpD</i>	0	
	<i>clpE</i>	1	<i>clpE</i>
	<i>clpQ</i>	0	
	<i>clpY</i>	0	
	<i>clpX</i>	1	<i>clpX</i>
	<i>clpL</i>	0	
	<i>clpP</i>	1	<i>clpP</i>
Régulateurs de la réponse SOS	<i>recA</i>	1	<i>recA</i>
	<i>lexA</i>	0	

^a sur la base de l'annotation RAST ou des homologies identifiées

Ces résultats ont montré que les gènes codant pour la pyruvate oxydase *pox* et la superoxyde dismutase *sodA* étaient présents dans le génome. Ce sont donc probablement les principaux gènes impliqués dans la synthèse du H₂O₂ par *L. garvieae*. La souche serait également capable de résister aux peroxydes produits en présence de O₂ grâce à la présence la peroxyrédoxine AhpC et son cofacteur AhpF, ainsi que grâce au système de régénération par les thiorédoxines (TrxA1,

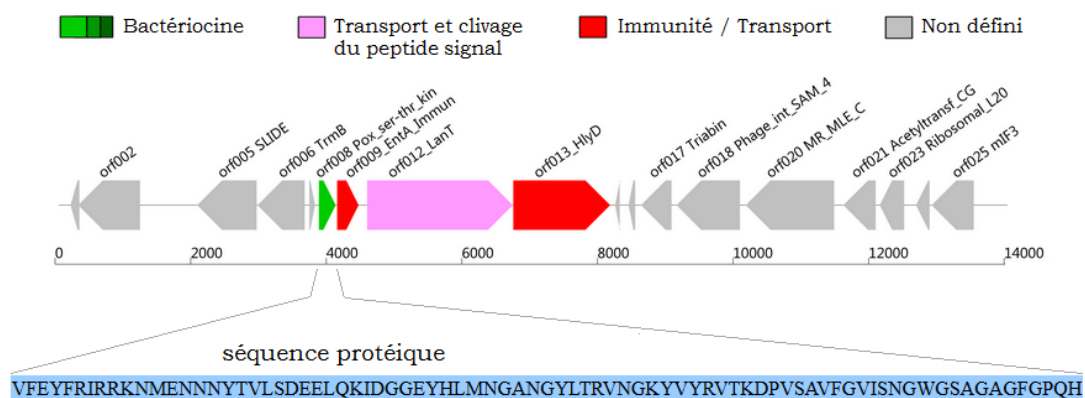
TrxA2, TrxB1 et TrxB2). Les deux enzymes pouvant réduire ou oxyder le glutathion, GshR et Grx, ont été identifiées. *L. garvieae* N201 ne semble pas posséder de glutarédoxine.

La souche N201 de *L. garvieae* dispose également des principaux gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif tels que les gènes codant pour les chaperonines, les protéines Clp et les régulateurs principaux HrcA, CtsR et σ^B . La présence de ces gènes est cohérente avec la capacité de cette bactérie à se développer en condition de divers stress oxydatifs (présence de H₂O₂, aérobiose vs. anaérobiose).

En revanche, *L. garvieae* ne dispose pas du gène codant pour le répresseur de la réponse SOS, *lexA*. A l'instar des souches Lg2 et ATCC 49156, la souche N201 possède un gène annoté « *hdiR* » (donnée non montrée), présentant 70% d'homologie avec le gène *hdiR* de *L. lactis*, espèce dans laquelle son rôle proche de celui de LexA (Eisen and Hanawalt, 1999; Savijoki et al., 2003) a été démontré. Cependant, cette homologie ne concerne que la partie terminale du gène *hdiR* de *L. lactis*, suggérant que le gène de *L. garvieae* serait tronqué et potentiellement inactif. L'absence de potentiel régulateur négatif connu (*lexA*, *hdiR*) chez *L. garvieae* suggère que la réponse SOS est dysfonctionnelle ou régulée de manière originale et encore mal définie.

Nous avons finalement recherché la présence de bactériocines dans le génome de *L. garvieae* N201 à l'aide du logiciel BAGEL3. Une seule bactériocine potentielle a été identifiée : la garvieacine Q (figure 11). Le gène identifié présentait 97% d'identité avec le gène de *L. garvieae* BCC 43578 codant pour la garvieacine Q (Tosukhowong et al., 2012).

Figure 11. Organisation du locus relatif à la bactériocine GarQ identifié suite à l'analyse par BAGEL3.



I.2.2. Détermination des gènes de virulence potentiels de *L. garvieae* N201

L'utilisation de *L. garvieae* N201 en tant qu'agent biopréservateur requiert son absence de virulence pour l'Homme. Nous avons donc recherché par BLASTn si des gènes homologues aux gènes de virulence répertoriés dans la base de données de VFDB (« Virulence Factors DataBase » : <http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>) étaient présents dans le génome de *L. garvieae* N201. Le résultat a été comparé à celui obtenu pour la souche Lg2 et d'autres espèces (Tableau 19).

Tableau 19. Gènes de virulence potentiellement identifiés dans le génome de plusieurs bactéries selon la E-value (recherche d'identité par BLASTn sur la base de données VFDB).

	Nombre si E-value ≤ 0,05	Nombre si E-value ≤ 0,01	si E-value ≤ 0,001	
			Nombre	Gènes
<i>Lactococcus garvieae</i> N201	11	8	5	<i>clpB, clpC, clpP, fbp/pavA, hasC</i>
<i>Lactococcus garvieae</i> Lg2	12	10	8	<i>clpB, clpC, clpE, clpP, fbp/pavA, hasB, hasC, lspA</i>
<i>Lactococcus lactis</i> II1403	10	8	5	<i>clpB, clpC, clpE, htpB, psaA</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6	24	22	22	-
<i>Staphylococcus aureus</i> SA15	78	77	75	-
<i>Staphylococcus aureus</i> MW2	86	82	82	-

Le nombre (5) et la nature des gènes de virulence identifiés chez *L. garvieae* N201 sont proches de ceux identifiés chez *L. lactis*, bactérie considérée comme non virulente pour l'Homme et bénéficiant du statut GRAS dans l'industrie laitière. Des gènes *clp* ont été identifiés mais leur rôle dans la virulence est indirect, ce sont plutôt des régulateurs métaboliques globaux. De même, le gène *hasC* est impliqué dans la synthèse de l'acide hyaluronique de *Streptococcus pyogenes* (Crater et al., 1995). Cette activité est liée à la synthèse de la capsule des streptocoques mais aussi à d'autres réactions métaboliques (Arrecubieta et al., 1994; Dougherty and van de Rijn, 1993). Enfin, une identité a été établie entre un gène de *L. garvieae* N201 et le gène *fbp* de *Streptococcus pyogenes* ou son homologue, le gène *pavA* de *Streptococcus agalactiae*. Ces gènes codent pour des protéines d'adhésion aux cellules humaines. Ces gènes de virulence ont été également identifiés dans le génome de *L. lactis* II1403 (donnée non montrée). Ceci suggère que

leur présence n'est pas suffisante pour induire un mécanisme de virulence fonctionnel contre l'Homme. Globalement, la souche *L. garvieae* N201 présente des homologies avec peu de gènes de virulence répertoriés en comparaison avec des bactéries pathogènes de l'Homme.

Les résultats similaires pour *L. lactis* IL1403, *L. garvieae* N201 et la souche pathogène en milieu aquatique, *L. garvieae* Lg2, suggèrent que les mécanismes de virulence spécifiques à *L. garvieae* ne sont pas bien caractérisés dans la base de donnée VFDB. En effet, l'analyse réalisée n'a relevé la présence d'aucun gène relatif à la synthèse de la capsule ou des hémolysines, pourtant présents, dans le génome de *L. garvieae* Lg2. Pour compléter notre analyse, nous avons donc recherché la présence de ces gènes dans le génome de *L. garvieae* N201 par BLASTn. La souche *L. garvieae* N201 ne possède aucun gène du cluster de la capsule identifiée chez *L. garvieae* Lg2. Cependant, trois hémolysines potentiellement impliquées dans la virulence de *L. garvieae* Lg2 (LCGL_0323 / LCGL_RS11635, LCGL_0597 / LCGL_RS12985, LCGL_0374 / LCGL_RS11890) ont été identifiées dans le génome de *L. garvieae* N201.

I.3. Conclusion de la partie I

La souche de *L. garvieae* ne semble pas posséder de mécanisme de virulence particulier contre l'Homme, confirmant les hypothèses décrites dans l'étude bibliographique. Par ailleurs, l'analyse du génome de cette souche a permis de formuler les hypothèses sur les mécanismes mis en jeu dans l'antagonisme contre *S. aureus*. Le métabolisme du H₂O₂ implique probablement majoritairement *pox* et *sodA* au niveau de la synthèse et *ahpC*, *ahpF*, *trxA1*, *trxA2*, *trxB1*, *trxB2* et *gpx* au niveau de sa dégradation. Pour aller plus loin, l'expression et la régulation de ces voies génétiques, ainsi que les phénotypes associés, devront être déterminés.

Article n°2 (genome announcement) : Genome sequence of *Lactococcus garvieae* N201 isolated from Saint-Nectaire cheese and showing anti-staphylococcal activities

Running title: Draft genome of *Lactococcus garvieae* N201 from cheese

¹#Stéphanie Bornes, ²Pierre Delpech, ²Etienne Rifa, ³Mathieu Almeida, ⁴Agnès Hébert, ³Anne-Laure Abraham, ⁴Valentin Loux, ⁵Françoise Irlinger, ²Marie-Christine Montel, ³Pierre Renault, ²Céline Delbès.

¹Laboratoire de Biologie, Clermont Université, Université d'Auvergne, IUT Aurillac, 63000 Clermont-Ferrand, France.

²Institut National de la Recherche Agronomique, UR 545 URF, 15000 Aurillac, France.

³Institut National de la Recherche Agronomique, UMR 14121 MICALIS, 78350 Jouy-en-Josas, France;

⁴AgroParisTech, UMR 782 GMPA, 78850 Thiverval-Grignon, France;

⁴Institut National de la Recherche Agronomique, MIG, 78350 Jouy-en-Josas, France

⁵Institut National de la Recherche Agronomique, UMR 782 GMPA, 78850 Thiverval-Grignon, France;

Corresponding author: stephanie.bornes@udamail.fr

Abstract.

Lactococcus garvieae, well known as a fish pathogen, is also ubiquitous in food such as raw milk dairy products. We report the draft genome sequence of *L. garvieae* N201 strain which was isolated from Saint-Nectaire cheese and showed anti-staphylococcal activities associated with hydrogen peroxide production.

Lactococcus garvieae is one of the most important fish pathogens, responsible for lactococcosis (1), and has been also associated with animal and human infections (2, 3). It is commonly isolated from healthy animals (4, 5) and various food niches, such as vegetables (6, 7), meat (8, 9) and dairy products. It is also a major component of cheese manufactured from raw milk (10, 11). To date, the genome sequences of 13 *L. garvieae* isolated from fish (12-15), cheese (15, 16), meat (17), human blood (18), mallard duck intestines (19), fermented broccoli (20) and Timber Rattlesnake feces (21) have been released.

We report the draft genome sequences of *L. garvieae* N201, isolated from Saint-Nectaire cheese. *L. garvieae* N201 has been shown to inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* in pasteurized, microfiltered and raw milk and in cheese (22, 23), but little is known about the underlying mechanisms. The inhibition involved the production of hydrogen peroxide by *L. garvieae* N201 in aerated culture broth (22).

L. garvieae N201 genome sequence was determined using a multi-strain controlled DNA pool sequencing strategy, combining Illumina HiSeq 2000 and SOLiD 4 technologies, as described by Almeida *et al.* (24). The assembly was first performed using SOAPdenovo (v1.04) (25) and optimized using Velvet (26). Scaffold gaps were filled using SOAPdenovo GAPCloser (25). The draft genome sequence of *L. garvieae* N201 included 27 contigs covering 1,979,109 bases pairs with a G+C content of 39.6% (GC calculator (<http://www.genomicsplace.com>)) (24). No plasmid was identified. Functional annotation was performed on the 27 contigs by the RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) server (27) and checked by BLASTP analysis (28). A total of 1,936 predicted coding sequences (CDSs) were classified into 291 subsystems (sets of related functional roles). Forty-one RNAs were annotated. In order to confirm

assembly realized by multi-strain DNA pool strategy (24) and to improve the annotation, RNA-seq experiments using Illumina HiSeq 2000 technology (Delpech P., unpublished data) were performed on pure cultures of *L. garvieae* N201. RNA sequences were mapped using Bowtie (29) on *L. garvieae* N201 genome sequence and on the 13971 other contigs of the pool not attributed to a genome sequence. This procedure confirmed that the assignment procedure produced a high quality genome draft (completion and absence of contaminant contigs).

Considering *L. garvieae* N201 as having a bio-preservative potential, it was of interest to check the presence of pathogenic characters. Virulence of *L. garvieae* Lg2 for fish is, in part, dependent on strain ability to form a capsule (6, 30). However, the capsular genes cluster identified in the *L. garvieae* Lg2 genome (13) was not found in the genome of *L. garvieae* N201 using local Blast2seq application. BAGEL3 software allowed the identification of one putative garvieacin Q encoding gene which has 97% identity with *L. garvieae* BCC 43578 *garQ* (31). Moreover, *L. garvieae* N201 genome contains 3 homologs of α -hemolysins found in *L. garvieae* Lg2 (13), 8831, UNIUD074 and 21881 (32) genomes.

A more detailed analysis of this genome and comparative genomes analyses will expand our knowledge about intraspecific genetic variation of this ubiquitous bacterium, and provide candidate genes potentially involved in pathogen growth inhibition.

Nucleotide sequence accession numbers. The Whole Genome Shotgun project has been deposited in DDBJ/EMBL/GenBank under accession number Gb0034836 (GOLD Biosample ID) (*Lactococcus garvieae* N201). The version described in this article is the first version.

Acknowledgements. This work was partly supported by the ANR grant "Food Microbiomes" (ANR-08-ALIA-007-02) coordinated by P.R. and additional funding from the Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière (France). We thank Cécile Callon for her help for strain cultivation and DNA extraction.

References.

1. Vendrell D, Balcázar JL, Ruiz-Zarzuela I, de Blas I, Gironés O, Múzquiz JL. 2006. *Lactococcus garvieae* in fish: a review. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 29:177–198.
2. Chan JFW, Woo PCY, Teng JLL, Lau SKP, Leung SSM, Tam FCC, Yuen KY. 2011. Primary infective spondylodiscitis caused by *Lactococcus garvieae* and a review of human *L. garvieae* infections. Infection 39:259–264.
3. Navas ME, Hall G, El Bejjani D. A case of endocarditis caused by *Lactococcus garvieae* and suggested methods for identification. J Clin Microbiol. 2013 Jun; 51(6):1990-2.
4. Kawanishi M, Yoshida T, Yagashiro S, Kijima M, Yagyu K, Nakai T, Murakami M, Morita H, Suzuki S. 2006. Differences between *Lactococcus garvieae* isolated from the genus *Seriola* in Japan and those isolated from other animals (trout, terrestrial animals from Europe) with regard to pathogenicity, phage susceptibility and genetic characterization. J. Appl. Microbiol. 101:496–504.
5. Tejedor JL, Vela AI, Gibello A, Casamayor A, Domínguez L, Fernández-Garayzábal JF. 2011. A genetic comparison of pig, cow and trout isolates of *Lactococcus garvieae* by PFGE analysis. Lett. Appl. Microbiol. 53:614–619.
6. Kawanishi M, Yoshida T, Kijima M, Yagyu K, Nakai T, Okada S, Endo A, Murakami M, Suzuki S, Morita H. 2007. Characterization of *Lactococcus garvieae* isolated from radish and broccoli sprouts that exhibited a KG+ phenotype, lack of virulence and absence of a capsule. Lett. Appl. Microbiol. 44:481–487.
7. Chen YS, Ootoguro M, Lin YH, Pan SF, Ji SH, Yu CR, Liou MS, Chang YC, Wu HC, Yanagida F. *Lactococcus formosensis* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from yan-tsai-shin (fermented broccoli stems). Int J Syst Evol Microbiol. 2014 Jan;64(Pt 1):146-51.
8. Aquilanti L, Garofalo C, Osmani A, Silvestri G, Vignaroli C, Clementi F. 2007. Isolation and molecular characterization of antibiotic-resistant lactic acid bacteria from poultry and swine meat products. J Food Prot 70:557–565.
9. Rantsiou K, Urso R, Iacumin L, Cantoni C, Cattaneo P, Comi G, Coccolin L. 2005. Culture-dependent and -independent methods to investigate the microbial ecology of Italian fermented sausages. Appl. Environ. Microbiol. 71:1977–1986.
10. Alegria A, Alvarez-Martín P, Sacristán N, Fernández E, Delgado S, Mayo B. 2009. Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casin, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. Int. J. Food Microbiol. 136:44–51.
11. Fortina MG, Ricci G, Acquati A, Zeppa G, Gandini A, Manachini PL. 2003. Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese. Food Microbiol. 20:397–404.
12. Aguado-Urda M, López-Campos GH, Gibello A, Cutuli MT, López-Alonso V, Fernández-Garayzábal JF, Mar Blanco MM. 2011. Genome sequence of *Lactococcus garvieae* 8831, isolated from rainbow trout lactococcosis outbreaks in Spain. J. Bacteriol. 193:4263–4264.
13. Morita H, Toh H, Oshima K, Yoshizaki M, Kawanishi M, Nakaya K, Suzuki T, Miyauchi E, Ishii Y, Tanabe S, Murakami M, Hattori M. 2011. Complete genome sequence and comparative analysis of the fish pathogen *Lactococcus garvieae*. PLoS One 6:e23184.

14. Reimundo P, Pignatelli M, Alcaraz LD, D'Auria G, Moya A, Guijarro JA. 2011. Genome sequence of *Lactococcus garvieae* UNIUD074, isolated in Italy from a lactococcosis outbreak. J. Bacteriol. 193:3684–3685.
15. Ricci G, Ferrario C, Borgo F, Rollando A, Fortina MG. 2012. Genome sequences of *Lactococcus garvieae* TB25, isolated from Italian cheese, and *Lactococcus garvieae* LG9, isolated from Italian rainbow trout. J. Bacteriol. 194:1249–1250.
16. Flórez AB, Reimundo P, Delgado S, Fernández E, Alegría A, Guijarro JA, Mayo B. 2012. Genome sequence of *Lactococcus garvieae* IPLA 31405, a bacteriocin-producing, tetracycline-resistant strain isolated from a raw-milk cheese. J. Bacteriol. 194:5118–5119.
17. Ricci G, Ferrario C, Borgo F, Eraclio G, Fortina MG. Genome Sequences of Two *Lactococcus garvieae* Strains Isolated from Meat. Genome Announc. 2013 Jan;1(1).
18. Aguado-Urda M, López-Campos GH, Mar Blanco MM, Fernández-Garayzábal JF, Cutuli MT, Aspiroz C, López-Alonso V, Gibello A. 2011. Genome sequence of *Lactococcus garvieae* 21881, isolated in a case of human septicemia. J. Bacteriol. 193:4033–4034.
19. Gabrielsen C, Brede DA, Hernández PE, Nes IF, Diep DB. Genome sequence of the bacteriocin-producing strain *Lactococcus garvieae* DCC43. J Bacteriol. 2012 Dec;194(24):6976–7.
20. Kawanishi M, Yoshida T, Kijima M, Yagyu K, Nakai T, et al. Characterization of *Lactococcus garvieae* isolated from radish and broccoli sprouts that exhibited a KG+ phenotype, lack of virulence and absence of a capsule. Lett Appl Microbiol. 2007;44:481–487.
21. McLaughlin RW, Cochran PA, Dowd SE. Isolation of *Lactococcus garvieae* Strain TRF1 from the Fecal Material of a Timber Rattlesnake. Curr Microbiol. 2014 Jul;69(1):63–8.
22. Delbes-Paus C, Dorchies G, Chaabna Z, Callon C, Montel MC. Contribution of hydrogen peroxide to the inhibition of *Staphylococcus aureus* by *Lactococcus garvieae* in interaction with raw milk microbial community. Food Microbiol. 2010 Oct; 27(7):924–32.
23. Alomar J, Loubiere P, Delbes C, Nouaille S, Montel MC. Effect of *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecalis* on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in microfiltered milk. Food Microbiol. 2008. May;25(3):502–8.
24. Mathieu Almeida, Agnès Hébert, Anne-Laure Abraham, Simon Rasmussen, Christophe Monnet, Nicolas Pons, Céline Delbès, Valentin Loux, Jean-Michel Batto, Pierre Leonard, Sean Kennedy, S. Dusko Ehrlich, Mihai Pop, Marie-Christine Montel, Françoise Irlinger, Pierre Renault. Construction of a dairy microbial genome catalog opens new perspectives for the metagenomic analysis of dairy fermented products. BMC Genomics. 2014 Dec 13;15:1101.
25. Luo R, Liu B, Xie Y, Li Z, Huang W, Yuan J, He G, Chen Y, Pan Q, Liu Y, Tang J, Wu G, Zhang H, Shi Y, Liu Y, Yu C, Wang B, Lu Y, Han C, Cheung DW, Yiu S-M, Peng S, Xiaoqian Z, Liu G, Liao X, Li Y, Yang H, Wang J, Lam T-W, Wang J: SOAPdenovo2: an empirically improved memory efficient short-read de novo assembler. Gigascience2012, 1:18.
26. Zerbino DR, Birney E: Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. Genome Res2008, 18:821–9.
27. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O. 2008. The RAST server: rapid annotations using subsystems technology. BMC Genomics 9:75.
28. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search Tool. J. Mol. Biol. 215:403–410.
29. Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. Genome Biol. 2009; 10(3):R25.
30. Yoshida T, Endo M, Sakai M, Inglis V. A cell capsule with possible involvement in resistance to opsonophagocytosis in *Enterococcus seriolicida* isolated from yellowtail *Seriola quinqueradiata*. Dis Aquat Org. 1997; 29:233–235.
31. Tosukhowong, A., Zendo, T., Visessanguan, W., Roytrakul, S., Pumpuang, L., Jaresitthikunchai, J., and Sonomoto, K. (2012). Garvieacin Q, a novel class II bacteriocin from *Lactococcus garvieae* BCC 43578. Appl. Environ. Microbiol. 78, 1619–1623.
32. Miyauchi E, Toh H, Nakano A, Tanabe S, Morita H. 2012. Comparative Genomic Analysis of *Lactococcus garvieae* Strains Isolated from Different Sources Reveals Candidate Virulence Genes. Int J Microbiol. 2012:728276.

PARTIE II : APPROCHE TRANSCRIPTOMIQUE

II.1. Matériel et méthodes

La méthodologie relative à ce travail est disponible dans les quatre premiers paragraphes de la partie « Materials and Methods » de l'article n°3, disponible à la suite du chapitre 3.

II.2. Résultats

L'adaptation de *L. garvieae* au changement d'aération et à la présence de *S. aureus* a été évaluée à 9 h de culture par une approche transcriptomique globale : le RNA-sequencing (« RNA-seq »). Le point 9 h a été choisi car il représentait la concentration minimale de *S. aureus* lorsque sa croissance était inhibée par *L. garvieae* ainsi que le pic de concentration en H₂O₂ en aération. Les données issues de ce travail, couplées aux données de la partie III, ont fait l'objet d'un article (article n°3, consultable à la fin du chapitre).

L'analyse globale par RNA-seq nous a permis d'observer que le transcriptome de *L. garvieae* n'était pas modifié directement par la présence de *S. aureus*, ni en aération ni en absence d'aération. Ceci suggère que le potentiel inhibiteur de *L. garvieae* vis-à-vis du pathogène qu'il inhibe n'est pas induit par la présence de celui-ci. En revanche, le transcriptome de *L. garvieae* a été fortement affecté par le changement d'aération (~18% des gènes), comme il avait déjà été observé pour *L. lactis* (Pedersen et al., 2008) ou *S. aureus* (Fuchs et al., 2007). De manière plus surprenante, nous avons montré que la réponse au niveau d'aération de plus de la moitié des gènes concernés était modulée par la présence de *S. aureus*. Les données de RNA-seq ont alors permis d'identifier quatre processus biologiques d'intérêt affectés par les facteurs modulant l'antagonisme de *L. garvieae* contre *S. aureus*. Premièrement, les processus biologiques relatifs au métabolisme primaire, c'est-à-dire les processus (post-)transcriptionnels et (post-)traductionnels, étant logiquement affectés par le changement des conditions de croissance, ils ne présentaient pas d'intérêt propre à la compréhension du mécanisme d'inhibition. Deuxièmement, les gènes de réponse au stress, liés au stress oxydatif, ont été majoritairement réprimés par l'aération (article n°3 : figure 1). Une analyse plus précise a mis en avant que l'aération affectait l'expression de gènes du métabolisme du O₂ de *L. garvieae*, effet fortement modulé par *S.*

aureus, et du métabolisme du H₂O₂, effet peu modulé par *S. aureus*. Les deux derniers processus biologiques principalement affectés par l'aération concernaient des gènes relatifs d'une part au métabolisme nutritionnel et d'autre part aux transports extracellulaires (article n°3 : figure 1 et 2). La modulation de ces processus étaient potentiellement associée à l'expression d'un autre effecteur de l'antagonisme.

Afin de confirmer la cohérence de nos données de RNA-sequencing et d'approfondir la caractérisation du métabolisme du O₂ et du H₂O₂, nous avons vérifié les niveaux d'expression de 10 gènes d'intérêt par RT-qPCR à 6 h, 9 h et 24 h. Nous avons obtenu une bonne adéquation entre les résultats obtenus à 9 h par RT-qPCR et par RNA sequencing (Tableau 20).

Tableau 20. Effet de l'aération sur l'expression de gènes déterminée par RNA-seq ou par RT-qPCR à 9 h (ratio de l'expression du gène en aération divisée par celle en absence d'aération).

Gène	expression en culture pure		expression en co-culture	
	RNA seq	RT-qPCR	RNA seq	RT-qPCR
<i>ahpC</i>	0,5	0,6	0,5	0,4
<i>ahpF</i>	0,3	0,3	0,4	0,4
<i>gpx</i>	0,9	0,7	0,8	0,9
<i>trxB1</i>	1,4	2,2	1,4	1,2
<i>ohrR</i>	3,8	2,2	4,3	3,1
<i>ohrA</i>	33,8	16,7	45,3	20,2
<i>noxE</i>	0,2	0,4	0,7	0,9
<i>lox</i>	0,2	0,2	0,5	0,4
<i>poxB</i>	0,4	0,4	0,5	0,4
<i>sodA</i>	1,2	1,7	1,3	1,1

Les valeurs indiquées correspondent aux valeurs brutes sans prise en compte de la significativité.

La modulation par *S. aureus* de la réponse de *L. garvieae* au changement d'aération pourrait s'expliquer principalement par des différences au niveau du métabolisme du O₂. En aération, la catalase de *S. aureus* pourrait avoir un effet primordial sur la dégradation de H₂O₂, et ainsi sur la concentration en O₂. Nous avons pu observer que les gènes de *L. garvieae* impliqués directement dans la consommation du O₂ du milieu étaient affectés par l'aération en culture pure alors que leur expression restait généralement stable en co-culture (article n°3 : table 2 et table S3). La variation d'expression de ces gènes, dont *noxE*, *lox*, et les gènes de l'ETC (Electron-Transport Chain, Chaîne Respiratoire) montre une analogie avec les résultats obtenus par Tachon et al.

(Tachon et al., 2010) sur *L. lactis*. Comme dans le cas de *L. lactis*, la NADH oxydase NoxE de *L. garvieae* pourrait être la principale responsable de la consommation en O₂ en phase exponentielle de croissance (pic d'expression à 6 h). Par la suite, les enzymes impliquées seraient plutôt celles de l'ETC. De plus, les variations de la concentration en O₂ causées par ces enzymes entraînent des variations importantes du potentiel d'oxydo-réduction dans les cultures de *L. lactis*. Le RNA-seq a révélé que l'expression de gènes liés aux processus d'oxydo-réduction de *L. garvieae* était modifiée par l'aération, effet parfois modulé par *S. aureus*. Ceci suggère que *L. garvieae* pourrait également réduire certains composés du BHI pour modifier le potentiel d'oxydo-réduction, ce qui pourrait avoir des conséquences sur le métabolisme de *S. aureus*.

Nous avons également observé plusieurs variations de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme du H₂O₂ essentiellement non-modulées par la présence de *S. aureus*. Afin d'affiner et confirmer les résultats de RNA-seq, obtenus seulement pour le temps 9 h, nous avons déterminé l'expression des gènes de synthèse (*pox*, *sodA*) et dégradation (*ahpC*, *ahpF*, *gpx*, *trxBI*) du H₂O₂ à partir des mêmes cultures que celles utilisées pour le RNA-seq, à 6 h, 9 h et 24 h par RT-qPCR. Les résultats combinés du RNA-seq (article n°3 : table S3) et des RT-qPCR (article n°3 : table 2) nous ont permis de conclure que les gènes de synthèse du H₂O₂ étaient peu ou pas affectés par le changement d'aération. Au contraire, les gènes de dégradation du H₂O₂ étaient globalement surexprimés en absence d'aération. Ceci nous a conduits à proposer que le métabolisme de *L. garvieae* engendrant la production de H₂O₂ serait actif quel que soit le niveau d'aération. Ainsi, la concentration en H₂O₂ inférieure en absence d'aération dans les cultures de *L. garvieae* pourrait s'expliquer à la fois par la plus faible disponibilité en O₂ mais aussi par l'induction des mécanismes de dégradation du H₂O₂. Comme il avait déjà été suggéré par Delbes-Paus et al. (Delbes-Paus et al., 2010), le peroxyde d'hydrogène pourrait également être présent sous un faible niveau d'aération, mais serait rapidement dégradé. En concentration très faible, il pourrait alors jouer un rôle modéré dans l'inhibition de *S. aureus*.

En parallèle, l'aération avait un effet, parfois modulé par *S. aureus*, sur l'expression de gènes reliés au métabolisme nutritionnel. Un tel résultat avait déjà été observé concernant l'effet de l'aération (Dijkstra et al., 2014; Pedersen et al., 2008) et de *S. aureus* (Nouaille et al., 2009) sur le transcriptome de *L. lactis*. Comme *L. garvieae* est capable de consommer rapidement la L-thréonine (Alomar et al., 2008b) et que cet acide aminé a été identifié comme essentiel pour la croissance de *S. aureus* dans des conditions de cultures proches de celles étudiées ici (Pohl et al.,

2009), la compétition pour la L-thréonine pourrait être impliquée dans l'antagonisme de *L. garvieae* contre *S. aureus*. Nous avons également observé que l'expression des gènes impliqués dans des fonctions de transport extracellulaire était modifiée par l'aération, effet modulé par la présence de *S. aureus*. Ainsi, *L. garvieae* pourrait modifier la matrice extracellulaire selon le niveau d'aération et la présence ou absence de *S. aureus*, ce qui pourrait donc jouer un rôle dans l'antagonisme contre *S. aureus*.

I.3. Conclusion

L'analyse transcriptomique globale de *L. garvieae* en condition d'inhibition de *S. aureus* a permis de mieux caractériser l'antagonisme de *L. garvieae* contre *S. aureus* à un niveau moléculaire et de formuler plusieurs hypothèses qui ont ensuite été évaluées sur un plan phénotypique :

- la présence de *L. garvieae* pourrait moduler le potentiel d'oxydo-réduction et jouer un rôle dans l'antagonisme contre *S. aureus*,
- *L. garvieae* produirait du H₂O₂ en condition non-aérée et cette production aurait un effet inhibiteur sur la croissance de *S. aureus*,
- l'inhibition pourrait également être causée par une compétition pour la L-thréonine
- l'inhibition pourrait également être causée par un effecteur extracellulaire.

PARTIE III : APPROCHE PHENOTYPIQUE

II.1. Matériel et méthodes

La méthodologie relative à ce travail est disponible dans le chapitre IV.2. de la section « Méthodologie » de ce manuscrit ainsi que dans le dernier paragraphe de la partie « Materials and Methods » de l'article n°3, disponible à la suite du chapitre 3.

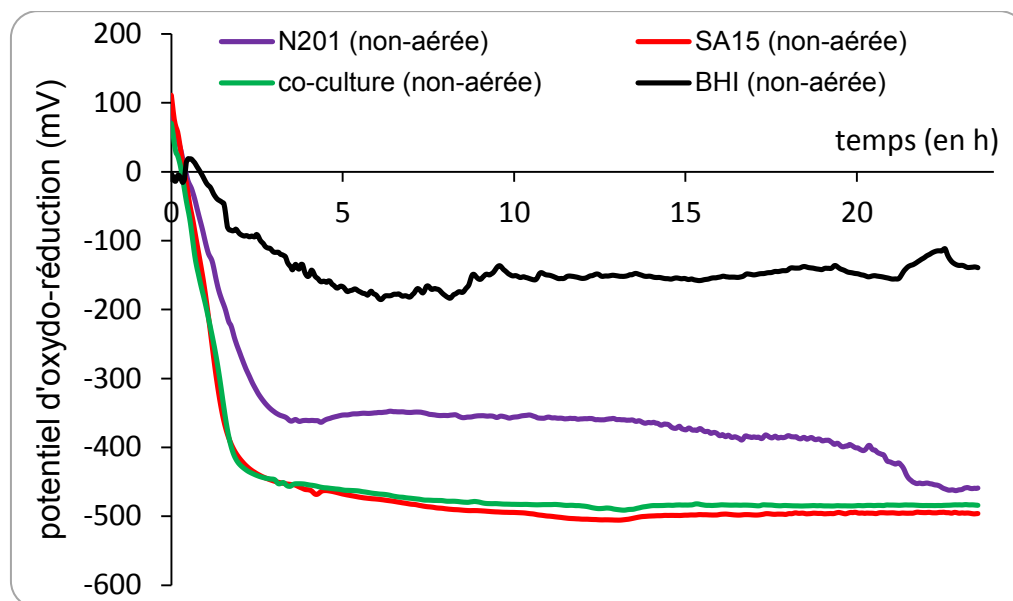
II.2. Résultats

Dans cette partie, l'objectif était de vérifier les hypothèses formulées suite à l'analyse transcriptomique (partie II). Certaines données issues de ce travail, couplées aux données de la partie II, ont fait l'objet d'un article (article n°3, consultable à la fin de ce chapitre).

*II.2.1. Hypothèse n°1 : Modification du potentiel d'oxydo-réduction durant l'interaction entre *L. garvieae* et *S. aureus**

La mesure du potentiel d'oxydo-réduction dans les cultures sous aération élevée n'était pas réalisable (cf. paragraphe IV.2.1 de la section « Méthodologie »). L'évolution du potentiel d'oxydo-réduction a donc été déterminée uniquement dans des cultures sous un niveau d'aération faible. Les résultats sont exposés figure 12 et n'indiquent que des tendances. Ainsi, sous faible aération, la présence de *L. garvieae* N201 et de *S. aureus* SA15 semble accentuer la chute rapide du potentiel d'oxydo-réduction. Ce phénomène est probablement lié à la consommation de O₂ résiduel et à la réduction du milieu par les bactéries, comme il a déjà été observé pour *L. lactis* en lait sous un faible niveau d'oxygène (Jeanson et al., 2009; Tachon et al., 2010). Sous un niveau d'aération faible, l'évolution du potentiel d'oxydoréduction dans la culture pure de *S. aureus* SA15 semble similaire à celle dans la co-culture en présence de *L. garvieae*. Ceci suggère le potentiel d'oxydo-réduction ne serait pas impliqué dans l'inhibition de *S. aureus* par *L. garvieae* sous un faible niveau d'aération.

Figure 12. Evolution du potentiel d'oxydo-réduction au cours du temps dans du BHI non-inoculé ou inoculé par *L. garvieae* N201 et / ou *S. aureus* SA15 en condition d'aération faible.



Excepté l'évolution dans la culture pure de *L. garvieae* N201 (moyenne de duplicats), les courbes représentent des expériences uniques.

II.2.2. Hypothèse n°2 : Production de H_2O_2 impliqué dans l'inhibition de *S. aureus* par *L. garvieae* en absence d'aération

Par un test de diffusion en milieu gélosé (BHI), nous avons montré que les surnageants provenant de cultures non-aérées de *L. garvieae* pouvaient inhiber la croissance de *S. aureus*. La présence de catalase dans la gélose supprimait cet effet inhibiteur (article n°3 : table S4).

Cette expérience a permis de prouver que *L. garvieae* pouvait produire du peroxyde d'hydrogène sous le faible niveau d'aération testé, ce H_2O_2 pouvant inhiber la croissance de *S. aureus*. La présence de O_2 étant nécessaire à cette production, elle pourrait être due à une oxygénation faible mais suffisante ou à du O_2 produit par le métabolisme interne des bactéries.

II.2.3. Hypothèse n°3 : l'inhibition de *S. aureus* par *L. garvieae* serait médiée par la compétition pour la L-thréonine

Comme la concentration en L-thréonine en BHI excède les besoins des souches bactériennes, un effet compétitif entre les deux bactéries était improbable dans ces conditions. Cependant, cet effet

devait être évalué dans un contexte de biopréservation en matrice alimentaire. La quantité de L-thréonine en lait microfiltré est relativement faible et est rapidement consommée par *L. garvieae* (Alomar et al., 2008b). Une complémentation, même forte (à hauteur de la concentration en BHI), en L-thréonine dans le lait microfiltré n'a cependant eu aucun effet sur l'inhibition de croissance (article n°3 : table S5). La compétition nutritionnelle pour la L-thréonine n'est donc probablement pas impliquée dans les mécanismes d'antagonisme de *L. garvieae* contre la croissance de *S. aureus*.

*II.2.4. Hypothèse n°4 : un autre effecteur de l'inhibition de *S. aureus* par *L. garvieae* serait extracellulaire*

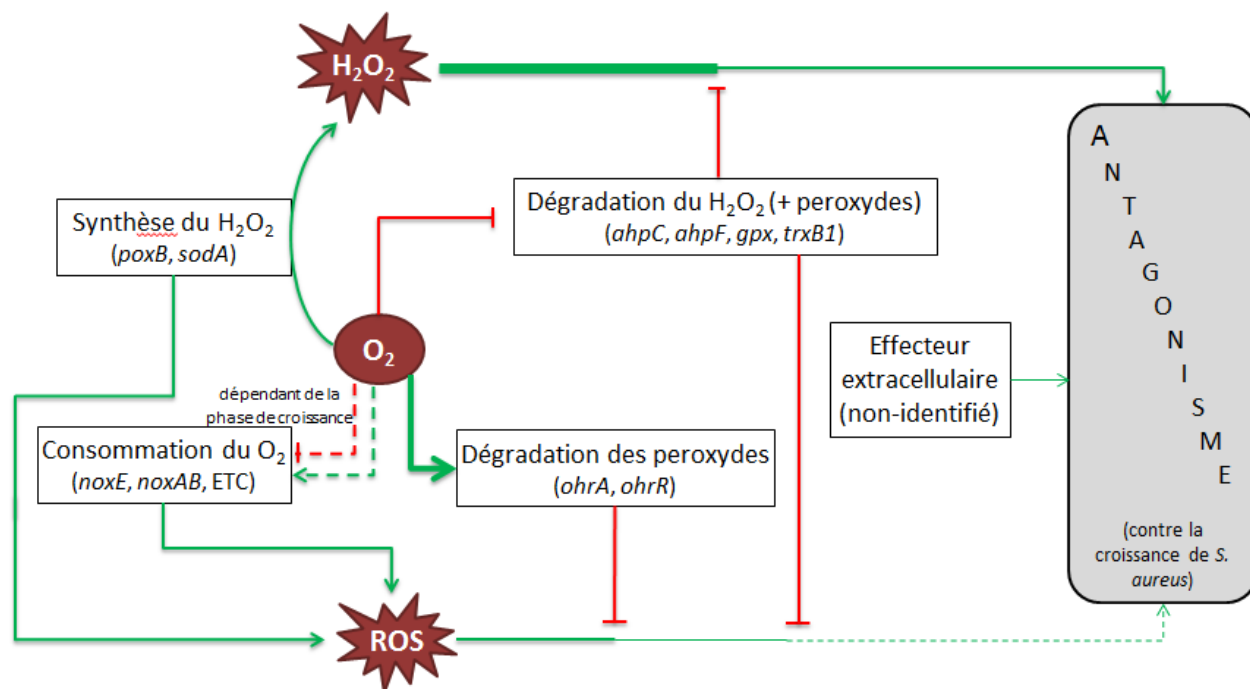
Nous avons recherché la présence d'un effecteur inhibiteur dans des surnageants de co-culture de *L. garvieae* N201 / *S. aureus* SA15 en phase exponentielle sous un faible niveau d'aération et en absence de H₂O₂ (ajout de catalase). Nous avons démontré que ce surnageant avait un effet inhibiteur sur la phase stationnaire de croissance de cultures pures de *S. aureus*, suggérant la présence d'un nouvel effecteur impliqué dans l'antagonisme (article n°3 : figure S1). Les résultats du RNA-seq ayant mis en exergue la modulation par l'aération et par *S. aureus* de l'expression de transporteurs impliqués dans des voies métaboliques différentes, nous avons supposé que ces voies pouvaient conduire à l'expression de cet effecteur. Nous avons alors traité les surnageants par divers enzymes pour valider ou invalider nos hypothèses. Nos résultats ont montré que cet effecteur n'était ni associé à une compétition nutritionnelle quelconque, ni de nature protéique (donc pas la garvieacine Q), ni de nature lipidique, ni de nature polysaccharidique. En revanche, l'effet inhibiteur du surnageant de co-culture semblait éliminé par autoclavage à 121°C durant 12 min (un seul réplicat, donnée non montrée). Cet effecteur pourrait être lié à l'homéostasie ionique et/ou des métaux ou à des signaux de stress ou de quorum sensing.

CHAPITRE 3 : BILAN

Nos résultats nous ont conduits à proposer que le contrôle par *L. garvieae* du H_2O_2 autogène était majoritairement effectué par les mécanismes de dégradation du peroxyde d'hydrogène et non par ceux de synthèse. Ainsi, une partie de l'inhibition de *S. aureus* par *L. garvieae* observée sous un faible niveau d'aération serait due à la présence, faible mais suffisante, de peroxyde d'hydrogène. Nos résultats suggèrent également l'existence d'un autre effecteur de l'inhibition, mais sa nature est encore inconnue. Il serait extracellulaire et aurait un effet négatif sur la phase stationnaire de croissance de *S. aureus*.

Les résultats de ce travail ont été synthétisés dans la figure 13.

Figure 13. Mécanismes moléculaires impliqués dans l'antagonisme de *L. garvieae* contre la croissance de *S. aureus*.



Les régulations sont indiquées par des flèches (← en vert pour une régulation positive ; T en rouge pour une régulation négative). Les pointillés indiquent des régulations incertaines ou variables selon un paramètre.

Article n°3 : New insights into the biopreservative potential of *Lactococcus garvieae* against *Staphylococcus aureus* using RNA sequencing profiling

Pierre Delpech^{a, #}, Etienne Rifa^a, Sabine Nidelet^{b,1}, Emeric Dubois^b, Geneviève Gagne^c, Marie-Christine Montel^a, Céline Delbès^a, Stéphanie Bornes^{c, #}

^a INRA, UR545, Unité de Recherches Fromagères, 20 côte de Reyne, 15000 Aurillac, France

^b MGX, c/o Institut de Génomique Fonctionnelle, 141 rue de la Cardonille, F-34094 Montpellier Cedex 5, France

^c Université Clermont Auvergne, Université d'Auvergne, Laboratoire de Biologie, IUT Antenne d'Aurillac, Département Génie Biologique, 100, rue de l'égalité, 15013 Aurillac cedex, France

¹ Present address: INRA, UMR 1062, Centre de Biologie pour la Gestion des Populations, 755 avenue du campus Agropolis, 34988 Montferrier-sur-Lez, France.

[#] Corresponding authors: Pierre Delpech (e-mail: pierre.delpech@clermont.inra.fr; tel: +33471456418) and Stéphanie Bornes (e-mail: stephanie.bornes@udamail.fr; tel: +33471455753)

Abstract

Biopreservative potential of *Lactococcus garvieae* lies on its capacity to inhibit the growth of *staphylococci*, especially *S. aureus*, in dairy products and *in vitro*. *In vitro*, this effect is modulated by the aeration level because of the production of hydrogen peroxide (H₂O₂) by *L. garvieae* under aeration. To better understand H₂O₂-related inhibition mechanism at the transcriptomic level and to identify other mechanisms potentially involved, we determined the transcriptomic response of *L. garvieae* to changing aeration level and to presence or absence of *S. aureus* by RNA sequencing. *L. garvieae* transcriptome was drastically modified by changes in aeration level mainly in biological processes related to fundamental functions and nutritional adaptation. The transcriptomic response of *L. garvieae* to changing aeration level was modulated by *S. aureus* presence. The higher concentration of H₂O₂ under the high aeration level was not associated with a higher expression of *L. garvieae* H₂O₂-synthesis genes (*pox*, *sodA*, *spxA1*) but rather with a repression of *L. garvieae* H₂O₂-degradation genes (*trxB1*, *ahpC*, *ahpF*, *gpx*). Moreover, the presence of another extracellular inhibition effector was evidenced *in vitro*. This effector was neither a protein (bacteriocin), nor a lipid, nor a polysaccharide, nor related to a deficiency in L-threonine. Analysis of the *L. garvieae* transcriptome highlighted changes in several processes suggesting that this effector may be related to transport of various components (vitamins, metal homeostasis) or to signal molecules (stress, quorum sensing).

Keywords

Lactococcus garvieae, *Staphylococcus aureus*, hydrogen peroxide, transcriptome, growth inhibition, biopreservation

Introduction

Interest for Lactic Acid Bacteria (LAB) as biopreservative agents against foodborne pathogens has been growing for the last 15 years (1–4). Dairy industry has a potential interest in *Lactococcus garvieae* because of its ubiquity in dairy products. This bacteria has been isolated from milk (5–7) and dairy products (8–17) from different origins. Considering their technological properties, the use of *L. garvieae* strains as starter or adjunct cultures has been suggested provided that these strains are safe (18). Biopreservative interest of *L. garvieae* lies particularly on its capacity to inhibit the growth of *staphylococci*, and especially *S. aureus*, as already observed in milk, in cheeses and *in vitro* (15, 19–21). Conversely to most of other LAB (15, 22), *L. garvieae* biopreservative potential is likely not associated with acidification or nutritional competition mechanisms (15).

Under high aeration, *S. aureus* inhibition is mainly associated with hydrogen peroxide (H_2O_2) produced by *L. garvieae*, as already observed *in vitro* (20, 21). Under low aeration, H_2O_2 is not detected and this inhibition is lower. The transcriptome of *L. lactis* is drastically modified by the aeration level (23). Several *L. lactis* H_2O_2 -metabolism genes (e.g. *ahpC*, *ahpF*, *gshR*, *sodA*, *gpx*) are differentially expressed depending on the aeration level (24). Biological functions of *L. lactis* related to aerobiosis, i.e. O_2 response, menaquinone metabolism and stress response, are variably affected by the presence of *S. aureus* (22). Little is known about the H_2O_2 -metabolism of *L. garvieae* as a biopreservative process. To our knowledge, changes in *L. garvieae* transcriptome in response to a pathogen and to aeration have never been investigated.

In this study, we better characterized the biopreservative potential of *L. garvieae* through RNA sequencing, an accurate and efficient method to reveal bacterial transcriptomic profiles (25). The expression of *L. garvieae* genes from *in vitro* cultures associated with changing aeration level and with changing biotic environment (absence or presence of *S. aureus*) was determined. Resulting data led us to a better understanding of *L. garvieae* hydrogen peroxide metabolism. Moreover, Delbes-Paus *et al.* (20) suggested the existence of another effector from *L. garvieae* involved in the residual *S. aureus* inhibition observed in absence of H_2O_2 (20). This study led to first hypotheses on the nature of this new effector.

Materials and Methods

Strains and culture conditions

Lactococcus garvieae N201 and *Staphylococcus aureus* SA15 were isolated from raw milk and obtained from the INRA UR545 collection (19). Both strains were aerobically grown in Brain-Heart Infusion broth (“BHI”, Biokar Diagnostic, Pantin, France) for 20 h, at 30°C for *L. garvieae* or at 37°C for *S. aureus*. Then, they were inoculated separately or in co-culture at 10^6 cells.mL⁻¹ for *S. aureus* or 10^7 cells.mL⁻¹ for *L. garvieae* in BHI buffered at pH = 7 with phosphate buffer KH_2PO_4 , $3H_2O/K_2HPO_4$ (KH_2PO_4 , $3H_2O$, Riedel-de-Haen, Honeywell GmbH, Seelze, Germany; K_2HPO_4 , Merck KGaA, Darmstadt, Germany) previously equilibrated at 30°C. Pure cultures and co-cultures of both strains were performed either under a high or under a low aeration level depending on the experiment. Low aeration level cultures were set in static fully filled and sealed 50-mL Nunc EZ Flip conical centrifuge tubes (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). The high aeration level was obtained with a mechanical shaking at 150 rpm on 50-mL cultures in 250-mL erlenmeyers. All cultures were incubated at 30°C for 24 h in an Infors HT Minitron (Infors AG, Bottmingen, Switzerland). The cultivable cell counts were determined after plating for each sampling time as described by Delpech *et al.* (21).

Sample preparation for RNA analyses

Pure cultures and co-cultures of *L. garvieae* N201 and *S. aureus* SA15 were performed under the high or the low aeration level. After 3 h, 6 h, 9 h and 24 h of incubation, 40 mL of each culture were centrifuged at $9,600 \times g$ for 10 min at 4°C. Hydrogen peroxide concentration and pH values were determined on the supernatants by enzymatic reaction and spectrophotometry as described by Delbes-Paus *et al.* (20). The

cell pellets were immediately frozen in an ethanol bath and then stored at -80°C. Extraction of total RNA from the frozen cell pellets was performed as described by Delpech et al. (21). For each sample of total RNA referring to one culture condition, a first aliquot part was used for RNA sequencing after rRNA depletion and a second aliquot part was used for RT-qPCR analyses. The whole experimental design was repeated three times.

Determination of *L. garvieae* transcriptome changes by RNA sequencing

Ribosomal RNAs were depleted from the total RNA (2 x 5 µg of RNA by sample) using a Magnetic Kit RiboZero for Gram Positive Bacteria (Illumina Inc., San Diego, California, USA) according to the manufacturer's instructions. The quality and concentration of RNA in each sample were assessed using a RNA 6000 pico kit (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). The following steps were performed by the MGX Platform (Montpellier GenomiX, CNRS, Montpellier, France) using Illumina kits and devices (Illumina Inc.): the construction of the mRNA library using a TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation Kit, the cluster generation with the cBot system using a Cluster Generation Kit, the hybridization of the sequencing primer on a the flow-cell, the 50-bp single-read sequencing using a HiSeq 2000 device with SBS technology and informatic pretreatments, i.e. the image analysis with the HiSeq Control Software and Real-Time Analysis component, the base-calling with the RTA software and the demultiplexing with CASAVA (Illumina).

The quality scores across all bases of all reads and the N (non-attributed bases) content across all bases were determined for each condition with the FastQC software from the Babraham Institute (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Both analyses showed good quality values (data not shown). The reads were next aligned simultaneously on *L. garvieae* N201 (unpublished, GOLD project ID = Gp0034836 and NCBI BioProject ID = 184287) and *S. aureus* MW2 (RefSeq number = NC_003923.1) reference genomes using the BWA package (26) with a seed of 32 bases and a maximum of 2 mismatches tolerated on the seed. Using the Samtools suite (27) we excluded from further analyses the reads with low alignment quality score (MAPQ index < 20). Reads which mapped on multiple sites (between 0.3% and 3.2% depending on the sample) or reads which did not map with any site considering the used stringency (between 8.7% and 15.5% depending on the sample) were excluded from further analysis (see Table S1 in the supplemental material). The counting of reads overlapping genes was performed with the HTSeq Count software in Union mode (28). Finally, we identified the significant differentially expressed genes using three different R (<http://www.R-project.org/>) packages: DESeq, DESeq2 and EdgeR. Differentially expressed genes were identified using the Bioconductor R (<http://www.R-project.org/>) packages EdgeR, DESeq and DESeq2 (29–31). Genes with less than 15 reads (cumulating the three biological replicates of two compared samples) were filtered and thus removed from the analysis. Data were normalized using the Relative Log Expression (RLE) normalization factor for EdgeR and the DESeq normalization factor for DESeq and DESeq2. Gene expression changes with adjusted p-value less than 0.05 (according to the FDR method from Benjamini-Hochberg) were declared differentially expressed. The differentially expressed genes highlighted by at least one of the three packages were considered for deeper investigation.

Genes were sorted in two lists: either genes differentially expressed in both the pure culture and the co-culture or genes differentially expressed only in pure culture or only in co-culture. These lists were submitted to a Blast2Go analysis (32) separately. Blast2Go analyses consisted first in a BLASTx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) on the nr database with 20 hits and a maximum E-value of $1.0E^{-15}$. The resulting data were enriched with an InterPro scan analysis (33). Blast hits of each sequence were then mapped with Gene Ontology (34) terms which was annotated with a maximum E-value of $1.0E^{-6}$, a cut-off of 55 and a GO weight of 5. The number of genes involved in each Biological Process GO category was calculated from combined graphs with no filter and a score alpha of 0.6. Since more than 450 different biological processes were identified for each category of genes, we excluded biological processes involving less than 9 genes. When several biological processes involved the same genes and

were associated with comparable functions, we considered only the most relevant of them according to our scientific hypotheses.

Determination of gene expression by RT-qPCR

Total RNA was retro-transcribed using a High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) following the supplier's instructions. Genes of interest (see Table S2 in the supplemental material) Ct were determined by RT-qPCR as described by Delpech et al. (21). All primers were designed using PrimerExpress® software (Applied Biosystems®, Life Technologies). By comparison with the Ct of the *tufB* reference gene stable in our conditions (data not shown), gene of interest ("goi") expression was calculated according to the formula introduced by Pfaffl (35):

$$\text{Expression of a } goi = \frac{(goi \text{ efficiency})^{\Delta Ct, goi}}{(tufB \text{ efficiency})^{\Delta Ct, tufB}}$$

The influence of two experimental factors was studied: the presence of *S. aureus* (under the high or the low aeration level, gene expression in co-culture divided by gene expression in pure culture) and the aeration level (in presence or absence of *S. aureus*, gene expression in shaken condition divided by gene expression in static condition). Statistical analyses were performed using Statistica software (StatSoft, Inc., StatSoft France, Maisons-Alfort, France) by the analysis of one-factor variance (ANOVA) followed by a Newmann-Keuls post-hoc test.

Impact of untreated or enzymatically treated *L. garvieae* culture supernatant on *S. aureus* growth

Impact of supernatants from co-cultures or from *L. garvieae* pure cultures on *S. aureus* was determined by two methods: by a well-diffusion agar test or through OD₆₀₀ monitoring of planktonic cultures.

Firstly, well-diffusion agar tests were performed with pure cultures of *L. garvieae* N201 and *S. aureus* SA15 under the high (only for *L. garvieae*) or the low aeration level. After 6 h, 9 h or 24 h of incubation, 2 mL of each culture were centrifuged at 9,600 x *g* for 10 min at 4°C and supernatants stored at 4°C for a maximum of 45 min. A well-diffusion agar test was performed, as described by Hernandez et al. (36) with slight modifications, using a 24-hour culture of *S. aureus* that was exposed to the supernatants or to a BHI-diluted H₂O₂ solution at 10 mM. *S. aureus* SA15 culture was spread (100 µL from a 1/10000^e dilution) on a Petri dish containing BHI-agar (BHI + 1.5% of agar) or BHI-agar supplemented with catalase at 400 U.mL⁻¹ (Sigma-Aldrich). Each supernatant (70 µL) was then poured into 9-millimeter wells previously dug in the agar. After prediffusion at room temperature during 1 h, the plates were incubated at 37°C for 48 h. The size of the inhibition zone for a well corresponded to the mean of four distances (corresponding to the same directions for all the wells) between a well edge and the first colony. A halo size value was considered (i.e. > 0) only if the four distances measured for a well were > 1 mm. The whole experimental design was repeated three times.

Secondly, the impact of supernatants from *L. garvieae* / *S. aureus* co-culture on the planktonic growth of *S. aureus* was measured by OD₆₀₀ monitoring over 25 h. Non-inoculated BHI and supernatant from a pure culture of *S. aureus* SA15 were used as controls. Prior to bacteria inoculation, catalase at 400 U.mL⁻¹ was added in all culture broths which were then incubated under the low aeration level. After 6 h of incubation, 40 mL of the cultures devoted to the supernatants preparation were centrifuged at 9,600 x *g* for 10 min at 4°C and supernatants stored at 4°C until their utilization. Four milliliters of the remaining *S. aureus* culture were centrifuged at 7,500 x *g* for 10 min and 20 mL of fresh 2X-concentrated buffered BHI were added to the cell pellet in order to obtain a 0.2X *S. aureus* culture. The supernatants were treated or not with proteases, i.e. proteinase K (AMRESCO LLC, Solon, Ohio, USA, ref: 0706-100MG) and pronase E (Merck KGaA, ref: 537088), with lipase (Sigma-Aldrich, ref: L3126-100G) or with α-amylase (Sigma-Aldrich, ref: A3176-500KU). According to supplier's indications, the enzymes were added at 6 mAnson-U/mL, 19.3 PUK/mL, 2 U/mL and 2.32 U/mL for proteinase K, pronase E, lipase and α-amylase in supernatants, respectively, that is to say at 0.2 mg. mL⁻¹ from stock solutions at 10 mg.mL⁻¹ prepared in 200 mM of

phosphate buffer at pH = 7. Treatments with lipase and α -amylase consisted in an incubation of the supernatants with the enzyme at 37°C during 5 h. Treatment with proteases consisted in a first incubation of the supernatants with proteinase K at 50°C during 2 h 15, then a second incubation with pronase E at 37°C during 2 h 15. After the incubation period, each enzyme was inactivated at 95°C for 15 min. Then, 0.2X *S. aureus* culture and treated or untreated supernatants were distributed in 1:1 volume ratio in a CytoOne 24-wells cell plate non-treated for cellular culture covered with a lid (STARLAB, Hambourg, Germany). The cell plate was incubated for 25 h in a spectrophotometer SAFAS Xenius XC (SAFAS Monaco, Monaco) and thermostated at 30°C with a Julabo CryoStat (JULABO GmbH, Seelbach, Germany). *S. aureus* growth in each well was determined by measuring the OD₆₀₀ every 15 min for 1 h and then every 30 min for 24 h. Before each OD₆₀₀ measurement, the cell plate was shaken at 5 Hz during 20 s with an orbital diameter of 6 mm. The whole experimental design was repeated three times. To identify sample means that were significantly different from each other, statistical analyses were performed on values at 9 h, 12 h, 15 h, 18 h, 21 h and 24 h, using Statistica software (StatSoft) by the analysis of one-factor variance (ANOVA) followed by a Newmann-Keuls post-hoc test.

Results

Determination of aeration and *S. aureus* effects on *L. garvieae* transcriptome by RNA sequencing

To determine the most relevant conditions for studying the transcriptome of *L. garvieae* N201 with respect to its capacity to inhibit *S. aureus* SA15, we followed the growth of the two bacteria in pure cultures or co-cultures in BHI during 24 h under the high or the low aeration level (Table 1). The growth of *L. garvieae* was not affected by *S. aureus*. The growth of *S. aureus* was inhibited by *L. garvieae* under both aeration levels. Under the high aeration level, maximal inhibition was observed from 9 h to 24 h. At 9 h, H₂O₂ concentration reached a peak concomitant to the lowest *S. aureus* concentration. Under the low aeration level, inhibition was lower than under the high aeration level and observed later, at 24 h. Concomitantly, H₂O₂ was not detected in these cultures. pH values remained between 6.9 and 7.1 in all cultures (data not shown).

Table 1. Evolution of cell counts and H₂O₂ concentration over 24 h in pure cultures or co-cultures of *L. garvieae* N201 and *S. aureus* SA15 in BHI broth under a high or a low aeration level.

Aeration level	Culture	<i>L. garvieae</i> cellular concentration (log [CFU.mL ⁻¹])					<i>S. aureus</i> cellular concentration (log [CFU.mL ⁻¹])					Hydrogen peroxide concentration (mM)				
		0 h	3 h	6 h	9 h	24 h	0 h	3 h	6 h	9 h	24 h	0 h	3 h	6 h	9 h	24 h
High	N201	6.6 ^a	7.3 ^a	8.4 ^a	9.0 ^a	8.6 ^a	NT	NT	NT	NT	NT	ND	NT	0.5 ^a	1.7 ^a	1.5 ^a
	SA15	NT	NT	NT	NT	NT	5.6 ^a	5.2 ^{ab}	6.1 ^a	7.4 ^a	9.0 ^a	ND	NT	ND	ND	ND
	N201 + SA15	6.5 ^a	7.4 ^a	8.5 ^a	8.6 ^a	8.7 ^a	5.6 ^a	4.8 ^a	3.9 ^b	3.4 ^b	4.5 ^b	ND	NT	0.5 ^a	1.6 ^a	1.5 ^a
Low	N201	6.6 ^a	7.4 ^a	8.4 ^a	8.7 ^a	8.9 ^a	NT	NT	NT	NT	NT	ND	NT	ND	ND	ND
	SA15	NT	NT	NT	NT	NT	5.6 ^a	6.1 ^c	7.0 ^a	7.3 ^a	8.0 ^c	ND	NT	ND	ND	ND
	N201 + SA15	6.5 ^a	7.3 ^a	8.8 ^a	8.8 ^a	8.9 ^a	5.6 ^a	5.6 ^{bc}	6.2 ^a	6.5 ^a	6.2 ^d	ND	NT	ND	ND	ND

^{a,b,c} a different letter indicates values which are significantly different (p-value < 0.05 by Newman-Keuls method) through one table column. ND = not detectable values (below the H₂O₂ detection limit using the spectrometry method). NT = not tested.

Considering these data, we chose to analyze the *L. garvieae* transcriptome in pure culture and in co-culture with *S. aureus* after 9 h of incubation under the high and the low aeration levels. RNA sequencing generated a number of reads by sample varying from 12,365,133 to 15,670,131 depending on the sample after the initial quality filter (see Table S1 in the supplemental material). From 83.1% to 91.0% of these reads mapped correctly on the reference genomes. Analysis of the mapped reads showed that no *L. garvieae* gene expression was significantly modified by *S. aureus* itself (data not shown). The expression of ~18% of *L. garvieae* genes, i.e. 358 genes, was modified by changing aeration level (see Table S3 in the supplemental material). The expression of 181 of these genes was modified independently of *S. aureus* presence (i.e. similarly in pure culture and in co-culture). The expression of 177 *L. garvieae* responded differently to changing aeration level depending on the presence or absence of *S. aureus*: 88 gene expressions were modified exclusively in pure culture and 89 gene expressions were modified exclusively in co-culture.

Effect of the aeration level on the *L. garvieae* biological processes

After RNA sequencing data treatments, 22 Gene Ontology biological processes related to *L. garvieae* genes differentially expressed depending on the aeration level in pure culture as well as in co-culture were identified using Blast2Go (Figure 1). Changes in gene expressions were shown in Table S3 in the supplemental material.

Most of the biological processes affected were related to fundamental growth functions (Fig. 1A and 1B) and nutrition (Fig.1C). Under the high aeration level, two genes (*ilvA*, LCGN_1922) related to “threonine metabolism” were repressed while two genes (LCGN_1919, LCGN_1920) was overexpressed.

Fourteen genes related to “transport” biological process were differentially expressed depending on the aeration level both in pure culture and co-culture, and among them genes involved in the transport of metals (lead, cadmium, zinc, copper and / or mercury) and vitamins (riboflavin and folate).

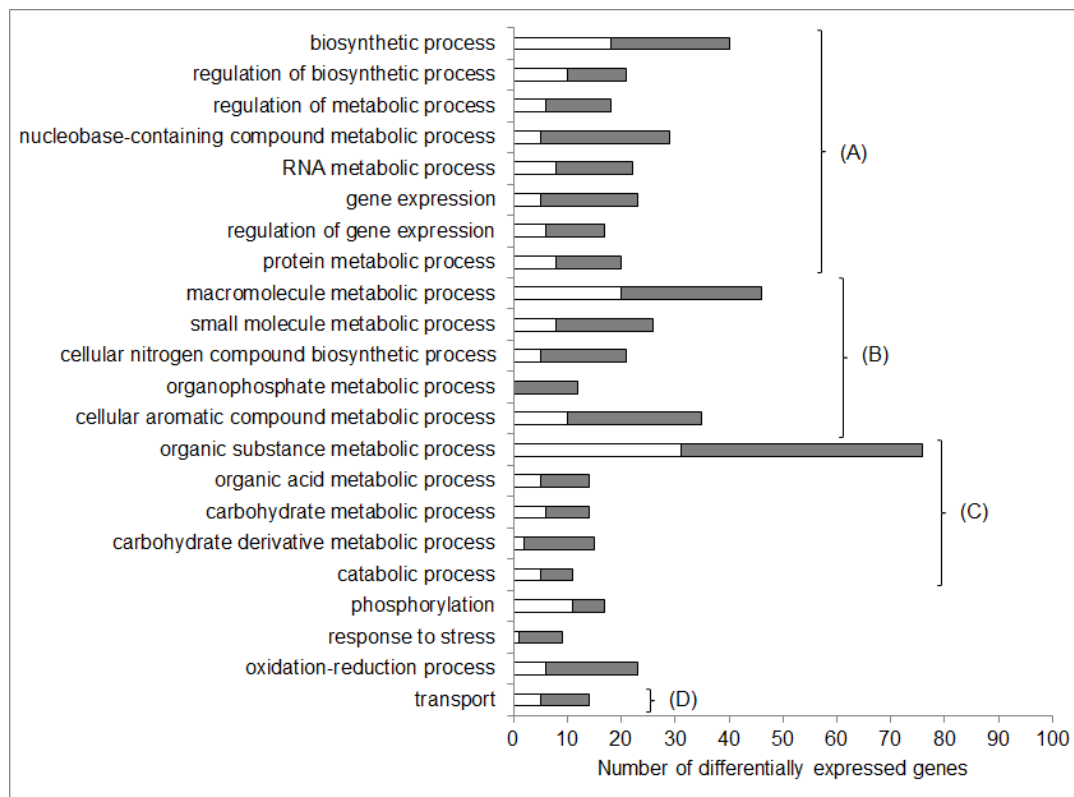
Genes and GO biological processes related to O₂ and H₂O₂ metabolisms were affected. “Oxidation-reduction process” and “response to stress” biological processes involved more repressed genes (17 and 8, respectively) than overexpressed genes (6 and 1, respectively). Three genes related to H₂O₂ metabolism (*ahpF*, *pox* and *spxA1*) and one gene related to O₂ consumption (*lox*) were repressed under the high aeration level. Several stress response genes (*hrcA*, *groES*, *groEL*, *dnaK*, *dnaJ*, *grpE*, *clpB* and five genes belonging to universal stress protein family) were repressed as well. Genes related to peroxide resistance (*ohrA* and *ohrR*) were strongly overexpressed under the high aeration level. Electron Transport Chain (ETC) genes (*cydB*, *menH* and *ubiE*) were overexpressed.

Modulation by *S. aureus* of aeration effect on *L. garvieae* biological processes

We identified 27 Gene Ontology biological processes related to genes differentially expressed depending on the aeration level either in pure culture or in co-culture (Figure 2). Changes in gene expressions were shown in Table S3 in the supplemental material.

Most of the biological processes affected were related to fundamental growth functions (Fig. 2A, 2B), or nutrition (Fig. 2C). Four genes of the lysine metabolism (LCGN_0575, LCGN_0576, LCGN_0577, LCGN_0578) and 2 genes of the threonine metabolism (LCGN_0576 and LCGN_0577) were induced under the high aeration level only in pure culture. Four genes of the galactose metabolism were induced under the high aeration level exclusively in co-culture (LCGN_1809, LCGN_1810, LCGN_1811 and LCGN_1812).

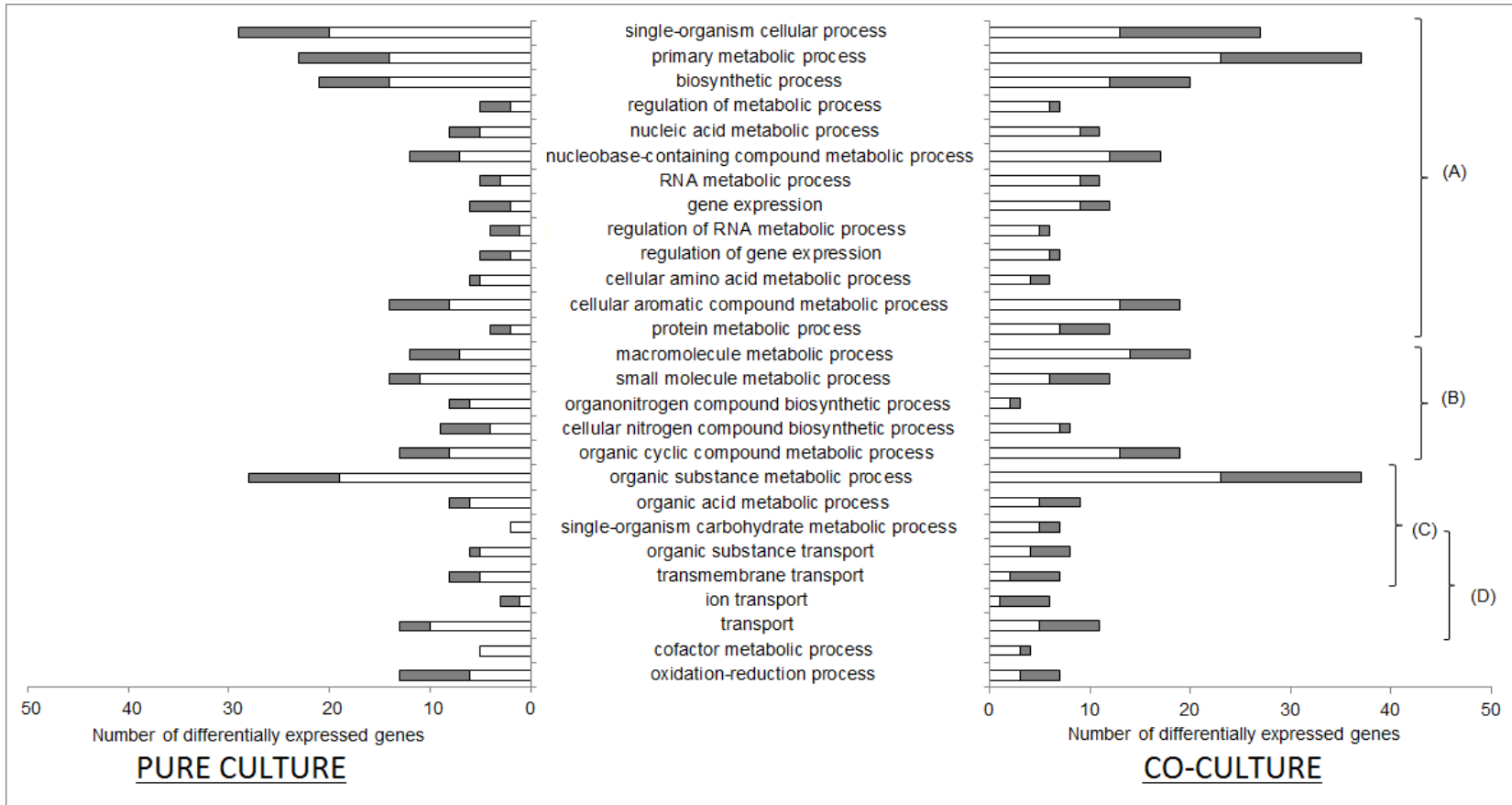
Figure 1. High aeration level effect on *L. garvieae* biological processes involving genes differentially expressed in both pure culture and co-culture.



Compiled bars represent the number of genes repressed (grey bars) or overexpressed (white bars) under the high aeration level as compared with the low aeration level after the Blast2Go analysis and data filtering. Biological processes were manually sorted according to their relation with a global function: (A) processes related to fundamental growth function, i.e. global cellular, metabolic and biosynthetic processes, (post-)transcriptional and (post-)translational functions, (B) processes potentially associated with fundamental growth functions but also potentially associated with other metabolisms, (C) nutrition-related processes and (D) transport processes.

Additionally, four biological processes related to transport functions were highlighted (Fig. 2D): “transport”, “transmembrane transport”, “organic substance transport” and “ion transport”. In pure culture, genes involved in the transport of cobalt/zinc/cadmium (LCGN_1867) and an unspecified monosaccharide (LCGN_0332) were overexpressed under the high aeration while a gene involved in the transport of copper (LCGN_1427) was repressed. Two genes of the *fur* regulon (ferrous iron transport) were overexpressed under the high aeration level: one in pure culture (*feoA*), one in co-culture (*feoB*). The H_2O_2 -degradation gene *ahpC* was repressed under the high aeration level in co-culture but not in pure culture. In pure culture, two genes related to O_2 consumption, *noxE* and LCGN_0208, were repressed and six genes related to ETC, *cydA*, *cydC*, *menB*, *menC*, *menD* and LCGN_0364, were overexpressed.

Figure 2. High aeration level effect on *L. garvieae* biological processes involving genes differentially expressed exclusively in pure culture or exclusively in co-culture.



Compiled bars represent the number of genes repressed (grey bars) or overexpressed (white bars) under the high aeration level exclusively in pure culture (left) or exclusively in co-culture (right) after the Blast2go analysis and data filtering. Biological processes were manually sorted according to their relation with a global function: (A) processes related to fundamental growth function, i.e. global cellular, metabolic and biosynthetic processes, (post-)transcriptional and (post-)translational functions, (B) processes potentially associated with fundamental growth functions but also potentially associated with other metabolisms, (C) nutrition-related processes and (D) transport processes.

Impact of aeration on the expression of potential *L. garvieae* biopreservation-related genes

To better understand the molecular mechanisms underlying *L. garvieae* biopreservative potential, we focused on the expression of ten genes involved in the O₂ metabolism potentially related to *S. aureus* inhibition mechanism. These genes were involved in O₂ consumption (*noxE* and *lox*), H₂O₂ synthesis (*pox* and *sodA*), H₂O₂ degradation (*ahpC*, *ahpF*, *gpx* and *trxB1*) and resistance to other peroxides (*ohrA* and *ohrR*). Their expression was determined at 6 h, 9 h and 24 h by RT-qPCR from the same cultures as those used for RNA sequencing.

S. aureus induced only slight changes in their expression (data not shown). Under the high aeration level, *ahpC* and *pox* were 2.4-time and 2.0-time overexpressed by *S. aureus* at 6 h, respectively. Under the low aeration level, *S. aureus* induced a 3.1-time overexpression of *trxB1* at 9 h and a 3.3-time repression of *gpx* at 24 h.

Conversely, RT-qPCR results showed major modifications in H₂O₂-metabolism gene expression induced by the changing aeration level (Table 2). The expression of *ohrA* was strongly induced under the high aeration level in pure culture and in co-culture at 9 h. While *trxA2* was identified as upregulated under the high aeration level in pure culture and in co-culture at 9 h (Table S3) by RNA sequencing, other H₂O₂-degradation genes (*ahpC*, *ahpF*, *gpx* and *trxB1*) were identified as repressed at 6 h, 9 h or 24 h by RT-qPCR. The lactate monooxygenase gene *lox* seemed slightly repressed under the high aeration level but this modification was significant only at 9 h in co-culture. In pure culture, the expression on *noxE* reached a peak at 6 h under the high aeration level when it was 11.0-time higher than under the low aeration level. Under the low aeration level, *noxE* expression gradually increased over time. No significant change on the expression of H₂O₂-synthesis genes (*pox* and *sodA*) depending on the aeration level was observed.

Table 2. Modification of the expression of *L. garvieae* H₂O₂ metabolism regulation genes in pure culture or co-culture by the aeration level, as determined by RT-qPCR.

Gene category	Up-regulated under high aeration level							Downregulated under high aeration level						
	Gene	Pure culture			Co-culture			Gene	Pure culture			Co-culture		
		6h	9h	24h	6h	9h	24h		6h	9h	24h	6h	9h	24h
degradation of H ₂ O ₂		NT					NT	<i>ahpC</i>		0.6 *		0.6 *	0.4 **	
								<i>ahpF</i>		0.3 **	NT		0.4 *	NT
								<i>gpx</i>			0.2 *			0.4 *
								<i>trxB1</i>			0.2 **			0.2 *
degradation of other peroxides	<i>ohrA</i>		16.7 **	NT	7.0 *	20.2 *	NT		NT					NT
O ₂ consumption / H ₂ O synthesis	<i>noxE</i>	11.0 **						<i>noxE</i>		0.4 *	0.1 *			
		NT					NT	<i>lox</i>	NT			0.4 **	NT	

Ratios of gene expression under the high aeration level (shaken condition) versus the low aeration level (static condition) were determined at 6 h, 9 h, or 24 h in pure culture or in co-culture. Only significant ratios using the Newmann-Keuls test were shown (* = p-value < 0.1 and ** = p-value < 0.05). NT = not tested.

Effect of *L. garvieae* supernatants on *S. aureus* growth

Since the expression of H₂O₂-synthesis genes was not repressed, *L. garvieae* may be able to produce H₂O₂ under the low aeration level provided that enough O₂ was available. To verify this hypothesis, a well-diffusion agar test in presence or absence of catalase was performed and inhibition halos generated in

BHI-agar by *L. garvieae* culture supernatants on a *S. aureus* pure culture were measured (see Table S4 in the supplemental material). In absence of catalase, the halo sizes with supernatants from *L. garvieae* cultures after 6 h and 24 h of incubation under the low aeration level were similar to that under the high aeration level. Conversely, halos generated by supernatants from *L. garvieae* after 9 h of incubation were significantly wider under the high aeration level (4.5 mm) than under the low aeration level (2.5 mm). Halos generated by these *L. garvieae* supernatants and by 10 mM of BHI-diluted H₂O₂ were suppressed when catalase was added in BHI-agar.

Effect of enzymatically treated co-culture supernatants on *S. aureus* growth

Since 38 genes involved in transport functions were regulated by aeration and *S. aureus* presence, extracellular compounds other than H₂O₂ may be involved in *S. aureus* inhibition. We monitored the *S. aureus* growth (OD₆₀₀) over 24 h in a medium composed of BHI and supernatants prepared from H₂O₂-free *L. garvieae* and *S. aureus* co-cultures under the low aeration level in presence of catalase. Results are shown in Figure S1 in the supplemental material.

During the stationary phase, the OD₆₀₀ measured in *S. aureus* cultures in presence of untreated supernatant from *L. garvieae* and *S. aureus* co-culture was lower than that in presence of untreated supernatant from *S. aureus* pure culture. Growth of *S. aureus* in presence of non-inoculated BHI was comparable to that in presence of supernatant from *S. aureus* pure culture (data not shown). At the end of the experiment, *S. aureus* concentration (UFC.mL⁻¹) measured in presence of co-culture supernatant was 1.5 times lower than in presence of untreated *S. aureus* pure culture supernatant (data not shown). This inhibition was still observed when supernatants were treated with proteases, lipase or α -amylase.

Discussion

This study aimed to better characterize *L. garvieae* metabolisms associated with biopreservation mechanisms, through the example of *S. aureus* inhibition. To our knowledge, this is the first study investigating the transcriptome of *L. garvieae* with respect to its anti-pathogenic potential. The expression changes observed by RT-qPCR and by RNA sequencing were in agreement (Table 2 and Table S3), thus confirming the consistency of our results.

The highest aeration level and the resulting highest H₂O₂ concentration were associated with the highest inhibition level of *S. aureus*, which confirmed previous observations in the same conditions (15, 20, 21). It is known that changes in the aeration level is associated with drastic modification of the transcriptome of *L. lactis* (23, 24) and with likely related metabolic adaptations (23, 24, 37, 38). The highest aeration level was also associated with drastic modifications of the *L. garvieae* transcriptome in biological processes related to fundamental growth functions, nutritional and metabolic adaptations and transport functions.

The presence of *S. aureus* did not directly induce changes in *L. garvieae* transcriptome. This could be explained by the considerably lower cellular concentration of *S. aureus* compared to *L. garvieae* over the kinetics. However, the presence of *S. aureus* modulated the aeration effect on *L. garvieae* transcriptome. While *L. garvieae* is a catalase-negative bacterium, the main *S. aureus* enzyme involved in H₂O₂ dismutation is the catalase KatA (39). In aerated co-cultures, the *S. aureus* catalase may affect the *L. garvieae* transcriptomic response to the changing aeration level through the modulation of O₂ and H₂O₂ concentrations. Consistently, the main enzymes involved in O₂ consumption in *L. lactis*, i.e. NADH-oxidase NoxE and ETC enzymes (40), were repressed in *L. garvieae* under the high aeration level only in pure culture. The expression of the *L. garvieae* *noxE* reached a peak at 6 h (beginning of exponential growth) and then decreased until 24 h under the high aeration level. This suggested that *L. garvieae* NoxE is the main responsible for O₂ consumption at the beginning of exponential growth under aeration, as observed for *L. lactis* NoxE (40, 41). The induction of most of the *L. garvieae* ETC genes (*cydA*, *cydB*, *cydC*, *menB*, *menC*, *menD*, *menH* and LCGN_0364) under aeration at 9 h (beginning of stationary phase) suggested that ETC may rather be involved in O₂ consumption during the stationary phase in *L. garvieae*, as already shown in *L. lactis* (40, 42). It is known that aeration regulates the expression of *S. aureus*

virulence factors (43) and also the biopreservative effect of *L. garvieae* on *S. aureus* growth (20, 21). Therefore this modulation of *L. garvieae* response to aeration by *S. aureus* presence may be an important factor of *L. garvieae* biopreservative potential against *S. aureus*.

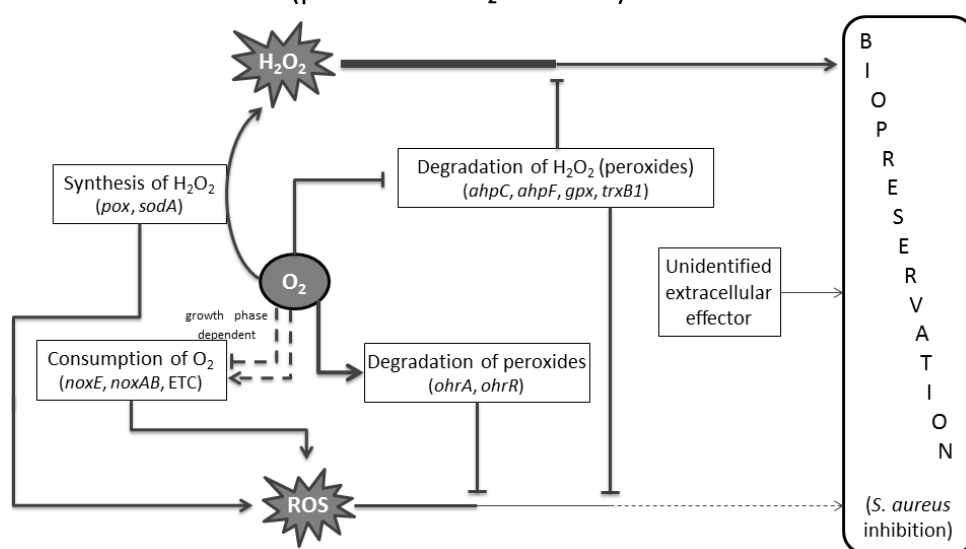
Previous studies showed hydrogen peroxide production by *L. garvieae* depends on the aeration level and plays a key role in *S. aureus* inhibition (20, 21), but little was known about the H₂O₂ metabolism in *L. garvieae* whatever the aeration level. While H₂O₂ was undetectable by spectrometry method under the low aeration level, the well-diffusion agar test suggested it was still present in sufficient concentration to impair *S. aureus* growth. This result confirmed that of Delbes-Paus et al. (20) who observed that *S. aureus* growth inhibition under the low aeration level was partially released by addition of catalase. The inhibition of *S. aureus* by low H₂O₂ concentrations under the low aeration level could be explained by an increased sensitivity to H₂O₂. Indeed, it is known that the aeration level could affect the *S. aureus* transcriptome (44) and especially the expression of H₂O₂-response genes (21). As regards *L. garvieae*, RNA-sequencing and RT-qPCR analyses showed an overexpression of the H₂O₂-degradation genes *ahpC*, *ahpF*, *gpx* and *trxB1* under low aeration in comparison to high aeration while the expression of H₂O₂-synthesis genes *pox* and *sodA* remained stable. Although the difference in H₂O₂ concentration between the two aeration levels was likely primarily conditioned by the availability of O₂, our transcriptomic results suggest that it was also associated with a *L. garvieae* control of H₂O₂ degradation rather than with a control of H₂O₂ synthesis. The widespread organic hydroperoxide detoxifying system *ohrAR*, known to be overexpressed by high O₂ level (45–51), was consistently induced under the high aeration level in *L. garvieae*. Since peroxiredoxin system AhpCF was repressed, the OhrAR system was likely preponderant in *L. garvieae* resistance to ROS (other than H₂O₂) under the high aeration level.

Additionally to H₂O₂ metabolism, this analysis of *L. garvieae* transcriptome led us to explore two modified *L. garvieae* pathways which are potentially associated with biopreservative capacities: nutritional competition and production of extracellular compounds. The expression variations of *codY* gene, involved in nutritional adaptation (52, 53), and of several nutritional-related metabolisms (lysine, threonine, mannitol, aspartate, ribose, fructose and galactose) suggested differential nutritional adaptation of *L. garvieae* depending on the aeration level and the presence of *S. aureus*. In a rich medium like BHI, nutritional competition should be limited. Transcriptomic changes in *L. lactis*, related to nutritional competition with *S. aureus* have been observed in a minimal growth medium (22). It is known that *L. garvieae* can consume in less than 3 h all the L-threonine in microfiltered milk (15) and that *S. aureus* growth could be inhibited by L-threonine depletion (54). However, we showed that biopreservative potential of *L. garvieae* against *S. aureus* was not associated with its consumption of L-threonine in microfiltered milk (see Table S5 in the supplemental data).

RNA sequencing also revealed that the aeration level affected the expression of many genes encoding for extracellular transporters or related to extracellular transport. These changes suggested that *L. garvieae* could have modified the extracellular medium depending on the aeration level and on the presence of *S. aureus*. The supernatant of a *S. aureus* and *L. garvieae* co-culture after incubation under low aeration reduced *S. aureus* population reached at the stationary phase. The only putative bacteriocin identified in *L. garvieae* N201 genome was homolog to the garvieaecin Q (data not shown) belonging to bacteriocins of the class IId (55). Class IId bacteriocins are sensible to protease treatment as stringent as that we used in this study (76, 77). Therefore, the effector triggering the *S. aureus* growth inhibition during stationary phase was not a bacteriocin. In view of the results of enzymatic treatments on supernatants, the inhibitory gap during stationary phase was likely neither caused by hydrogen peroxide, nor by a protein, nor by a lipid, nor by a polysaccharide. This effector may be related to several genes identified as regulated by aeration level after RNA seq analysis, like genes involved in metal homeostasis, chemical and ionic equilibrium (58, 59), in transport of vitamin-related compounds (60) and in unknown proteins export. It may also be related to signal molecules (stress, quorum sensing). It is known that *L. garvieae* can modify the expression of several *S. aureus* genes belonging to environment-sensing systems like *agr* system, CodY or two-component systems SaeRS and SrrAB (21).

To conclude, RNA sequencing analyses revealed a transcriptomic adaptation of *L. garvieae* to the aeration level which was modulated by the presence of *S. aureus*. This led to a better understanding of potential biopreservative pathway used by *L. garvieae* against *S. aureus* summarized in Figure 3. Our findings confirmed that H_2O_2 could be produced by *L. garvieae* and inhibit *S. aureus* growth even under the low aeration level. In parallel, the control of autogenic H_2O_2 was likely carried out by H_2O_2 -degradation genes rather than by H_2O_2 -synthesis genes. Additionally, this study led us to suggest the involvement of an unidentified inhibitory effector that can take part on the inhibition of *S. aureus* observed during the stationary phase. The potential inhibitory role of metals and signal molecules (e.g. stress signal, quorum sensing) generated by *L. garvieae* should be investigated in order to identify this additional effector. In order to promote the use of H_2O_2 -producing bacteria as biopreservative agents, future studies should explore the relation between H_2O_2 -metabolism, H_2O_2 -producing LAB and the pathogen they inhibit.

Figure 3. Potential biopreservative pathways used by *L. garvieae* against *S. aureus* and their relation with the aeration level (presence of O_2 and ROS).



Regulations are indicated by different arrows (\leftarrow for a positive regulation and \vdash for a negative regulation). Dotted lines indicated hypothesized or variable relationships. Hydrogen peroxide was formed by H_2O_2 -forming enzymes Pox and SodA from O_2 or free radicals. This H_2O_2 could be degraded by a set of enzymes which are mainly repressed in presence of oxygen. Degradation by these enzymes could be higher under the low aeration level. NADH-oxidase NoxE and ETC enzymes were induced or repressed under the high aeration level depending on the growth phase. Their activity generated ROS which could be degraded by peroxide-degrading enzymes. Among ROS, H_2O_2 is involved in biopreservation of *S. aureus* while the biopreservative potential of other ROS is still unclear. Although the inhibition of *S. aureus* was mainly caused by H_2O_2 , another effector, still unidentified, could act as a biopreservative agent.

Acknowledgements:

The authors would like to thank Adrien Nivoliez for his help in the determination of our RNAs quality in the Probionov laboratory, Magali Cordaillat-Simmons, David Tropel, Laurent Rios, Monique Zagorec, Yves Le Loir, Pierre Renault, Hélène Falentin and Christophe Chassard for their helpful advices and (???) for English proofreading.

Pierre Delpech was the recipient of a PhD fellowship from the FEDER (*Fond Européen de Développement Economique et Régional*) and the Auvergne region with the support of the Pharmabiotic Research Institute

(PRI) cluster. This research received partial funding from the ANR (*Agence Nationale de la Recherche*, ANR-08-ALIA-011 NABAB project).

References:

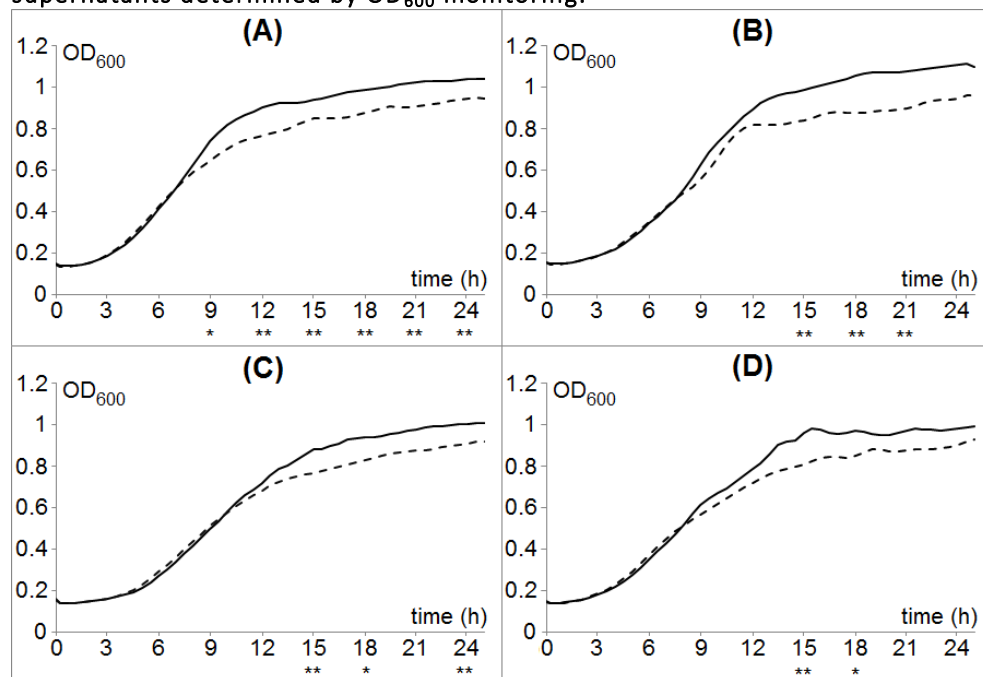
1. Adesokan IA, Ekanola YA, Okanlawon BM. 2010. Influence of cultural conditions on hydrogen peroxide production by lactic acid bacteria isolated from some Nigerian traditional fermented foods. *Afr J Microbiol Res* **4**:1991–1996.
2. Batdorj B, Trinetta V, Dalgalarondo M, Prévost H, Dousset X, Ivanova I, Haertlé T, Chobert J-M. 2007. Isolation, taxonomic identification and hydrogen peroxide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* T31, isolated from Mongolian yoghurt: inhibitory activity on food-borne pathogens. *J Appl Microbiol* **103**:584–593.
3. Charlier C, Cretenet M, Even S, Le Loir Y. 2009. Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. *Int J Food Microbiol* **131**:30–39.
4. Ito A, Sato Y, Kudo S, Sato S, Nakajima H, Toba T. 2003. The Screening of Hydrogen Peroxide-Producing Lactic Acid Bacteria and Their Application to Inactivating Psychrotrophic Food-Borne Pathogens. *Curr Microbiol* **47**:0231–0236.
5. Devriese LA, Hommez J, Laevens H, Pot B, Vandamme P, Haesebrouck F. 1999. Identification of aesculin-hydrolyzing streptococci, lactococci, aerococci and enterococci from subclinical intramammary infections in dairy cows. *Vet Microbiol* **70**:87–94.
6. Villani F, Aponte M, Blaiotta G, Mauriello G, Pepe O, Moschetti G. 2001. Detection and characterization of a bacteriocin, garviecin L1-5, produced by *Lactococcus garvieae* isolated from raw cow's milk. *J Appl Microbiol* **90**:430–439.
7. Callon C, Duthoit F, Delbès C, Ferrand M, Le Frileux Y, De Crémoux R, Montel M-C. 2007. Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year: molecular approaches. *Syst Appl Microbiol* **30**:547–560.
8. El-Baradei G, Delacroix-Buchet A, Ogier JC. 2008. Bacterial biodiversity of traditional Zabady fermented milk. *Int J Food Microbiol* **121**:295–301.
9. Jokovic N, Nikolic M, Begovic J, Jovicic B, Savic D, Topisirovic L. 2008. A survey of the lactic acid bacteria isolated from Serbian artisanal dairy product kajmak. *Int J Food Microbiol* **127**:305–311.
10. Flórez AB, Mayo B. 2006. Microbial diversity and succession during the manufacture and ripening of traditional, Spanish, blue-veined Cabrales cheese, as determined by PCR-DGGE. *Int J Food Microbiol* **110**:165–171.
11. Alegría A, Alvarez-Martín P, Sacristán N, Fernández E, Delgado S, Mayo B. 2009. Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casín, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. *Int J Food Microbiol* **136**:44–51.
12. Fortina MG, Ricci G, Foschino R, Picozzi C, Dolci P, Zeppa G, Cocolin L, Manachini P I. 2007. Phenotypic typing, technological properties and safety aspects of *Lactococcus garvieae* strains from dairy environments. *J Appl Microbiol* **103**:445–453.
13. Monfredini L, Settanni L, Poznanski E, Cavazza A, Franciosi E. 2012. The spatial distribution of bacteria in Grana-cheese during ripening. *Syst Appl Microbiol* **35**:54–63.
14. Pangallo D, Saková N, Koreňová J, Puškárová A, Kraková L, Valík L, Kuchta T. 2014. Microbial diversity and dynamics during the production of May bryndza cheese. *Int J Food Microbiol* **170**:38–43.
15. Alomar J, Loubiere P, Delbes C, Nouaille S, Montel MC. 2008. Effect of *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecalis* on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in microfiltered milk. *Food Microbiol* **25**:502–508.
16. Morandi S, Silvetti T, Miranda Lopez J m., Brasca M. 2015. Antimicrobial Activity, Antibiotic Resistance and the Safety of Lactic Acid Bacteria in Raw Milk Valtellina Casera Cheese. *J Food Saf* **35**:193–205.
17. Sip A, Wieckowicz M, Olejnik-Schmidt A, Gardo A, Gorlas R, Grajek W. 2009. Occurrence of lactic acid bacteria with activity against *Listeria* in Polish regional cheeses produced in the Tatrzan'Sko-Beskidzki District. *Acta Sci Pol - Biotechnol* **8**:27–44.
18. Fernández E, Alegría Á, Delgado S, Mayo B. 2010. Phenotypic, genetic and technological characterization of *Lactococcus garvieae* strains isolated from a raw milk cheese. *Int Dairy J* **20**:142–148.
19. Alomar J, Lebert A, Montel MC. 2008. Effect of temperature and pH on growth of *Staphylococcus aureus* in co-culture with *Lactococcus garvieae*. *Curr Microbiol* **56**:408–412.
20. Delbes-Paus C, Dorchies G, Chaabna Z, Callon C, Montel M-C. 2010. Contribution of hydrogen peroxide to the inhibition of *Staphylococcus aureus* by *Lactococcus garvieae* in interaction with raw milk microbial community. *Food Microbiol* **27**:924–932.
21. Delpéch P, Bornes S, Alaterre E, Bonnet M, Gagne G, Montel M-C, Delbès C. 2015. *Staphylococcus aureus* transcriptomic response to inhibition by H₂O₂-producing *Lactococcus garvieae*. *Food Microbiol*.
22. Nouaille S, Even S, Charlier C, Le Loir Y, Coccain-Bousquet M, Loubière P. 2009. Transcriptomic response of *Lactococcus lactis* in mixed culture with *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol* **75**:4473–4482.
23. Dijkstra AR, Alkema W, Starrenburg MJ, Hugenholtz J, van Hijum SA, Bron PA. 2014. Fermentation-induced variation in heat and oxidative stress phenotypes of *Lactococcus lactis* MG1363 reveals transcriptome signatures for robustness. *Microb Cell Factories* **13**.

24. Pedersen MB, Garrigues C, Tuphile K, Brun C, Vido K, Bennedsen M, Møllgaard H, Gaudu P, Gruss A. 2008. Impact of aeration and heme-activated respiration on *Lactococcus lactis* gene expression: identification of a heme-responsive operon. *J Bacteriol* **190**:4903–4911.
25. Pinto AC, Melo-Barbosa HP, Miyoshi A, Silva A, Azevedo V. 2011. Application of RNA-seq to reveal the transcript profile in bacteria. *Genet Mol Res GMR* **10**:1707–1718.
26. Li H, Durbin R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**:1754–1760.
27. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R, Subgroup 1000 Genome Project Data Processing. 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**:2078–2079.
28. Anders S, Pyl PT, Huber W. 2015. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **31**:166–169.
29. Anders S, Huber W. 2010. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* **11**:R106.
30. Love MI, Huber W, Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**:550.
31. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**:139–140.
32. Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M. 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* **21**:3674–3676.
33. Zdobnov EM, Apweiler R. 2001. InterProScan—an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. *Bioinformatics* **17**:847–848.
34. Consortium TGO. 2008. The Gene Ontology project in 2008. *Nucleic Acids Res* **36**:D440–D444.
35. Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**:e45.
36. Hernández D, Cardell E, Zárate V. 2005. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *J Appl Microbiol* **99**:77–84.
37. Jensen NBS, Melchiorson CR, Jokumsen KV, Villadsen J. 2001. Metabolic Behavior of *Lactococcus lactis* MG1363 in Microaerobic Continuous Cultivation at a Low Dilution Rate. *Appl Environ Microbiol* **67**:2677–2682.
38. Nordkvist M, Jensen NBS, Villadsen J. 2003. Glucose metabolism in *Lactococcus lactis* MG1363 under different aeration conditions: requirement of acetate to sustain growth under microaerobic conditions. *Appl Environ Microbiol* **69**:3462–3468.
39. Cosgrove K, Coutts G, Jonsson I-M, Tarkowski A, Kokai-Kun JF, Mond JJ, Foster SJ. 2007. Catalase (KatA) and Alkyl Hydroperoxide Reductase (AhpC) Have Compensatory Roles in Peroxide Stress Resistance and Are Required for Survival, Persistence, and Nasal Colonization in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **189**:1025–1035.
40. Tachon S, Brandsma JB, Yvon M. 2010. NoxE NADH Oxidase and the Electron Transport Chain Are Responsible for the Ability of *Lactococcus lactis* To Decrease the Redox Potential of Milk. *Appl Environ Microbiol* **76**:1311–1319.
41. Lopez de Felipe F, Hugenholtz J. 2001. Purification and characterisation of the water forming NADH-oxidase from *Lactococcus lactis*. *Int Dairy J* **11**:37–44.
42. Tachon S, Michelin D, Chambellon E, Cantonnet M, Mezange C, Henno L, Cachon R, Yvon M. 2009. Experimental conditions affect the site of tetrazolium violet reduction in the electron transport chain of *Lactococcus lactis*. *Microbiology* **155**:2941–2948.
43. Ster C, Gilbert FB, Cochard T, Poutrel B. 2005. Transcriptional profiles of regulatory and virulence factors of *Staphylococcus aureus* of bovine origin: oxygen impact and strain-to-strain variations. *Mol Cell Probes* **19**:227–235.
44. Fuchs S, Pane-Farre J, Kohler C, Hecker M, Engelmann S. 2007. Anaerobic Gene Expression in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **189**:4275–4289.
45. Atichartpongkul S, Fuangthong M, Vattanaviboon P, Mongkolsuk S. 2010. Analyses of the regulatory mechanism and physiological roles of *Pseudomonas aeruginosa* OhrR, a transcription regulator and a sensor of organic hydroperoxides. *J Bacteriol* **192**:2093–2101.
46. Chuchue T, Tanboon W, Prapagdee B, Dubbs JM, Vattanaviboon P, Mongkolsuk S. 2006. ohrR and ohr are the primary sensor/regulator and protective genes against organic hydroperoxide stress in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **188**:842–851.
47. Clair G, Lorphelin A, Armengaud J, Duport C. 2013. OhrRA functions as a redox-responsive system controlling toxinogenesis in *Bacillus cereus*. *J Proteomics* **94**:527–539.
48. da Silva Neto JF, Negretto CC, Netto LES. 2012. Analysis of the Organic Hydroperoxide Response of *Chromobacterium violaceum* Reveals That OhrR Is a Cys-Based Redox Sensor Regulated by Thioredoxin. *PLoS ONE* **7**.
49. Fuangthong M, Atichartpongkul S, Mongkolsuk S, Helmann JD. 2001. OhrR is a repressor of ohrA, a key organic hydroperoxide resistance determinant in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **183**:4134–4141.
50. Mongkolsuk S, Praituan W, Loprasert S, Fuangthong M, Chamnongpol S. 1998. Identification and characterization of a new organic hydroperoxide resistance (ohr) gene with a novel pattern of oxidative stress regulation from *Xanthomonas campestris* pv. phaseoli. *J Bacteriol* **180**:2636–2643.
51. Oh S-Y, Shin J-H, Roe J-H. 2007. Dual role of OhrR as a repressor and an activator in response to organic hydroperoxides in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **189**:6284–6292.
52. Ercan O, Wels M, Smid EJ, Kleerebezem M. 2015. Genome-wide transcriptional responses to carbon starvation in non growing *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* **81**:2554–2561.

53. **Guédon E, Serror P, Ehrlich SD, Renault P, Delorme C.** 2001. Pleiotropic transcriptional repressor CodY senses the intracellular pool of branched-chain amino acids in *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol* **40**:1227–1239.
54. **Pohl K, Francois P, Stenz L, Schlink F, Geiger T, Herbert S, Goerke C, Schrenzel J, Wolz C.** 2009. CodY in *Staphylococcus aureus*: a Regulatory Link between Metabolism and Virulence Gene Expression. *J Bacteriol* **191**:2953–2963.
55. **Tosukhowong A, Zendo T, Visessanguan W, Roytrakul S, Pumpuang L, Jaresitthikunchai J, Sonomoto K.** 2012. Garvieacin Q, a novel class II bacteriocin from *Lactococcus garvieae* BCC 43578. *Appl Environ Microbiol* **78**:1619–1623.
56. **Kuo Y-C, Liu C-F, Lin J-F, Li A-C, Lo T-C, Lin T-H.** 2013. Characterization of putative class II bacteriocins identified from a non-bacteriocin-producing strain *Lactobacillus casei* ATCC 334. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**:237–246.
57. **Song D-F, Zhu M-Y, Gu Q.** 2014. Purification and Characterization of Plantaricin ZJ5, a New Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* ZJ5. *PLoS ONE* **9**.
58. **Doyle JJ, Marshall RT, Pfander WH.** 1975. Effects of cadmium on the growth and uptake of cadmium by microorganisms. *Appl Microbiol* **29**:562–564.
59. **Chudobova D, Dostalova S, Ruttkay-Nedecky B, Guran R, Rodrigo MAM, Tmejova K, Krizkova S, Zitka O, Adam V, Kizek R.** 2015. The effect of metal ions on *Staphylococcus aureus* revealed by biochemical and mass spectrometric analyses. *Microbiol Res* **170**:147–156.
60. **Schlievert PM, Merriman JA, Salgado-Pabón W, Mueller EA, Spaulding AR, Vu BG, Chuang-Smith ON, Kohler PL, Kirby JR.** 2013. Menaquinone analogs inhibit growth of bacterial pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* **57**:5432–5437.

- SUPPLEMENTAL DATAS -

Supplementary figure 1. *S. aureus* growth in presence of enzymatically treated or untreated supernatants determined by OD₆₀₀ monitoring.



Growth of *S. aureus* in presence of supernatants from *S. aureus* pure cultures (solid lines) or from co-cultures (dotted lines). Supernatants were prepared from cultures with catalase and untreated (A), treated with proteases (B), α -amylase (C) or lipase (D). Significant differences using the Newmann-Keuls test were indicated by asterisks below the time point (* = p-value < 0.1 and ** = p-value < 0.05).

Supplementary table 1. Number of reads generated by RNA-sequencing for each condition after bioinformatics and filtering treatments.

Samples			Number of reads			
Culture	Aeration level	Replicate	Tot ^(a)	Map ^(b)	Multi ^(c)	Unk ^(d)
Pure culture	High	A	15,441,932	14,049,750	48,851	1,343,331
Pure culture	High	B	14,435,199	12,935,269	55,060	1,444,870
Pure culture	High	C	12,365,133	10,824,067	104,424	1,436,642
Pure culture	Low	A	13,461,986	11,669,070	428,462	1,364,454
Pure culture	Low	B	13,282,584	11,622,174	72,065	1,588,345
Pure culture	Low	C	11,447,286	9,828,863	72,059	1,546,364
Co-culture	High	A	12,835,317	11,508,274	54,644	1,272,399
Co-culture	High	B	13,823,339	12,111,806	371,004	1,340,529
Co-culture	High	C	13,627,195	12,156,053	43,826	1,427,316
Co-culture	Low	A	14,219,669	12,788,703	44,121	1,386,845
Co-culture	Low	B	15,670,131	13,426,626	459,401	1,784,104
Co-culture	Low	C	14,721,283	12,231,362	212,832	2,277,089

^(a) Tot = Total of reads generated on the HiSeq 2000 (Illumina) after the filtering of image. ^(b) Map = reads mapped on the two reference genomes (Map = Tot - Multi - Unk). ^(c) Multi = reads which mapped on at least two different sites of the references genomes. ^(d) Unk = reads which did not map with any site of the reference genomes (unknown reads).

Supplementary table 2. Targeted *L. garvieae* genes primers for qPCR analysis.

Gene	Description	Forward primer	Reverse primer
<i>tufB</i> ^a	elongation factor Tu	CTGGTATCGAAATGTTCCGTAAAA	CCACGGAGAAGTACACCAACGT
<i>ahpC</i>	alkyl hydroperoxidase C	GATAAAGTGCGTGCTGCACAAT	TTCCGCATCTTCTTTCCATTT
<i>ahpF</i>	alkyl hydroperoxidase F	ATTGCTTATTGTCCGCATTGTG	CTCCCCCAACTACGGCAACT
<i>gpx</i>	glutathione peroxidase	GTACAACTTTTCCACGCTTTCAAA	CCAGCGGGCTTCCTTTTT
<i>lox</i>	L-lactate 2-monooxygenase	CAGGACGACCAATGGCAACT	TGTACGTCGTGGTGAGCATGT
<i>noxE</i>	NADH oxidase	CACGCTAACGGTGCTAAAAAAGT	CCGTGGTTAGTGTTGAAAACGATAGTT
<i>ohrA</i>	organic hydrogen peroxide resistance A	CATGGGCCATTTCTAACAATTCT	TGTTGACATCGTCGGACACA
<i>ohrR</i>	organic hydrogen peroxide resistance regulator	TGCTTTCAACTGTACATTGCTTCTAA	AACGCATTGACGGTCATGTC
<i>poxB</i>	pyruvate oxidase	TGGCGTACATCTGGCTTGTTT	AAGTCTAGTTTGGCCGAAATCG
<i>sodA</i>	superoxide dismutase	ACCACACAATGTTCTGGGAATG	TGCTACAGCGATATCACCTGTTG
<i>trxBI</i>	thioredoxine reductase	GCCTTTAGCTGATCTTGGTGT	TTGATTGTTTTTGTTCACCATT

^a reference gene.

Supplementary table 3. Voir annexe 7 de la thèse.

Supplementary table 4. Size of *S. aureus* SA15 growth inhibition halos (mm) generated by diffusing supernatants of *L. garvieae* N201 or *S. aureus* or a H₂O₂ solution at 10 mM.

	Incubation time	Aeration level	<i>S. aureus</i> SA15 plated on BHI	
			BHI	BHI + catalase
<i>L. garvieae</i> N201	6 h	High	2.9 ^{ab}	0.3 ^c
<i>L. garvieae</i> N201	6 h	Low	2.0 ^a	0 ^c
<i>L. garvieae</i> N201	9 h	High	4.5 ^b	0.5 ^c
<i>L. garvieae</i> N201	9 h	Low	2.5 ^a	0 ^c
<i>L. garvieae</i> N201	24 h	High	2.5 ^a	0 ^c
<i>L. garvieae</i> N201	24 h	Low	3.9 ^{ab}	0 ^c
<i>S. aureus</i> SA15	24 h	Low	0 ^c	0 ^c
H ₂ O ₂ 10 mM			16.6 ^d	0 ^c

^{a,b,c,d} a different letter indicates values which are significantly different (p-value < 0.05 by Newman-Keuls method).

Supplemental data : Determination of L-threonine impact on *S. aureus* inhibition in microfiltered milk

Pure culture of *S. aureus* SA15 and co-cultures of *S. aureus* SA15 with *L. garvieae* N201 were performed, under the high or the low aeration level as specified in 2.1. with slight modifications. The cultures were performed in microfiltered milk (Marguerite, Candia, Lyon, France). Catalase at 400 U.mL⁻¹ (Sigma) and different concentrations (0 mM, 0.1 mM, 1 mM or 10 mM) of L-threonine (Merck KGaA) were added before the bacteria inoculations. The *S. aureus* growth was evaluated from cultivable cell enumerations after 3 h, 6 h, 9 h and 24 h of incubation by plating as described by Delpech et al. (2015). The whole experimental design was repeated independently three times.

Results are shown in supplementary table 5.

Under the high aeration level, *S. aureus* growth was not significantly inhibited by *L. garvieae* and the L-threonine supplementation had no effect. Under the low aeration, *S. aureus* growth was inhibited by *L. garvieae* at 24 h (difference in *S. aureus* cultivable cell counts of 0.6 log [UFC.mL⁻¹] between the pure culture and the co-culture). This low but significant inhibition was not suppressed by the L-threonine supplementation of 100 µM. Moreover, higher L-threonine supplementations (1 mM and 10 mM) did not suppress the inhibitory effect of *L. garvieae* in *S. aureus* growth (data not shown).

Supplementary table 5. Evolution of cell counts over 24 h in pure cultures or co-cultures of *L. garvieae* N201 and *S. aureus* SA15 in catalase-treated microfiltered milk under a high (shaking) or a low (static) aeration level and supplemented or not with 100 µM of L-threonine.

	<i>L. garvieae</i> presence Aeration level Threonine	-	-	+	+	-	-	+	+
		+	+	+	+	-	-	-	-
		-	+	-	+	-	+	-	+
<i>L. garvieae</i> cellular concentration (log [UFC.mL ⁻¹])	0 h	NT	NT	7.1 ^a	7.1 ^a	NT	NT	7.1 ^a	7.1 ^a
	3 h	NT	NT	7.3 ^a	7.4 ^a	NT	NT	7.4 ^a	7.4 ^a
	6 h	NT	NT	7.7 ^a	7.5 ^a	NT	NT	7.8 ^a	7.8 ^a
	9 h	NT	NT	7.8 ^a	7.7 ^a	NT	NT	7.9 ^a	8.1 ^a
	24 h	NT	NT	7.9 ^a	7.7 ^a	NT	NT	8.1 ^a	7.9 ^a
<i>S. aureus</i> cellular concentration (log [UFC.mL ⁻¹])	0 h	6.1 ^a	6.1 ^a	6.2 ^a	6.2 ^a	6.2 ^a	6.2 ^a	6.2 ^a	6.2 ^a
	3 h	6.6 ^a	6.6 ^a	6.5 ^a	6.6 ^a	6.6 ^a	6.6 ^a	6.6 ^a	6.6 ^a
	6 h	7.6 ^a	7.6 ^a	7.4 ^a	7.6 ^a	7.6 ^a	7.5 ^a	7.1 ^a	7.2 ^a
	9 h	8.3 ^a	8.4 ^a	8.0 ^{ab}	8.0 ^{ab}	8.0 ^{ab}	7.9 ^{ac}	7.2 ^{bc}	7.2 ^b
	24 h	8.7 ^a	8.7 ^a	8.7 ^a	8.8 ^a	8.1 ^a	8.2 ^a	7.5 ^b	7.5 ^b

^{a,b,c} a different letter indicates values which are significantly different (p-value < 0.05 by Newman-Keuls method) through one table row. NT = non-tested values.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

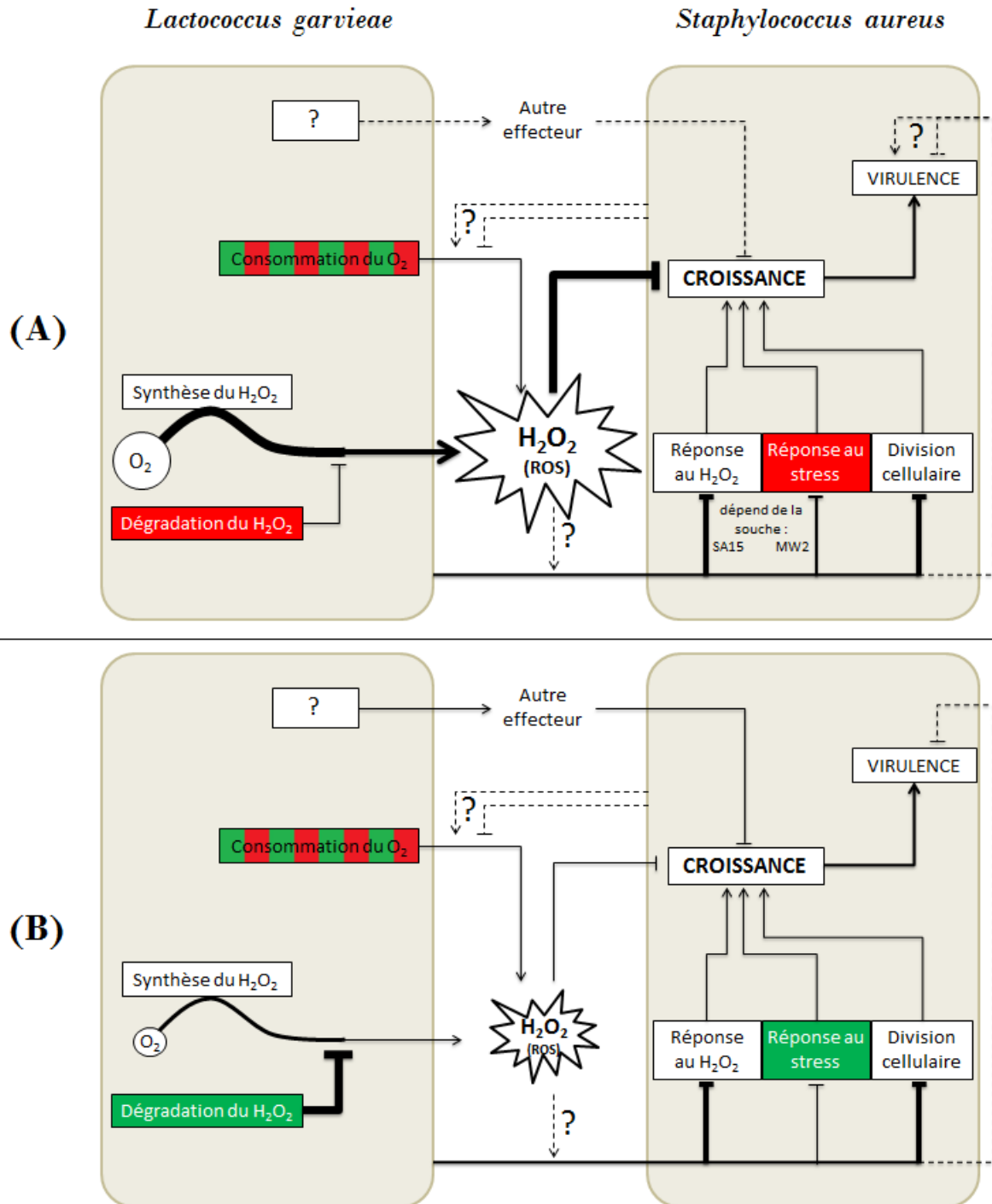
La connaissance des mécanismes sous-jacents à l'antagonisme de microorganismes protecteurs vis-à-vis d'un microorganisme indésirable est l'un des éléments nécessaires pour maîtriser un processus de biopréservation. Dans ce contexte, cette thèse avait pour but de mieux comprendre l'antagonisme de *L. garvieae* N201 vis-à-vis de *S. aureus*. Le rôle central du peroxyde d'hydrogène sous aération ayant déjà été montré (Delbes-Paus et al., 2010), **le métabolisme du H₂O₂ de *L. garvieae* ainsi que la réponse de *S. aureus* à la présence de cette molécule ont été explorés**. Au cours de cette étude, nous avons également identifié **trois autres mécanismes inhibiteurs potentiels**, discutés dans les paragraphes suivants. Les principaux résultats sont synthétisés dans la Figure 14.

Voie du peroxyde d'hydrogène : rôle et régulation durant la relation antagoniste

*Production et contrôle par *L. garvieae* :*

Dans un premier temps, il a été observé que **le niveau d'aération modulait l'expression des gènes de *L. garvieae* impliqués dans le métabolisme des peroxydes**, dont le H₂O₂, comme il avait déjà été observé dans le cas de *L. lactis* (Pedersen et al., 2008). En aération, la synthèse de H₂O₂ par *L. garvieae* serait due essentiellement à la pyruvate oxydase codée par *pox* et à la superoxyde dismutase codée par *sodA*, et celle des autres peroxydes pourrait être liée à l'ETC (« Electron Transport Chain », Chaîne Respiratoire). Or, nos résultats suggèrent que **les gènes de *L. garvieae* responsables de la formation de H₂O₂ (*pox*, *sodA*) seraient exprimés de manière constitutive quel que soit le niveau d'oxygène**. Un résultat comparable avait déjà été observé concernant *pox* chez *L. lactis* et *B. subtilis*, mais l'expression de *sodA* est plutôt induite par l'aération et la présence de peroxydes (Mostertz et al., 2004; Pedersen et al., 2008). Ainsi, comme il a déjà été observé dans le cas de souches de streptocoques (Ryan and Kleinberg, 1995), *L. garvieae* pourrait produire du H₂O₂ sous une faible aération à condition que assez de O₂ soit disponible (oxygénation faible mais suffisante ou O₂ formé à partir du métabolisme interne). Les résultats expérimentaux ont permis de valider cette hypothèse, déjà proposée par Delbes-Paus et al. (2010). Cette **production de peroxyde d'hydrogène a semblé suffisante pour inhiber la croissance de *S. aureus* in vitro**.

Figure 14. Mécanismes impliqués dans l'antagonisme de *L. garvieae* et réponse de *S. aureus* dans le cadre de l'interaction *L. garvieae* / *S. aureus* : (A) sous un niveau d'aération élevé ; (B) sous un niveau d'aération faible.



La couleur des processus indique s'ils sont favorisés (vert) ou défavorisés (rouge) dans la condition d'aération. Les régulations sont indiquées par des flèches (← en vert pour une régulation positive ; ⊥ en rouge pour une régulation négative). La largeur des flèches indique si une relation est accentuée dans la condition d'aération. Les pointillés indiquent des régulations incertaines ou variables selon un paramètre.

En parallèle, une répression des gènes de dégradation du H₂O₂ de *L. garvieae* (principalement *ahpC*, *ahpF*, *trxB1* et *gpx*) a été observée sous un niveau d'aération élevé (et donc en présence de H₂O₂). De manière étonnante, la régulation de l'expression de ces gènes de *L. garvieae* va à l'inverse de ce qui est généralement observé chez d'autres bactéries, telles que *L. lactis* et *B. subtilis*, où ces gènes sont plutôt induits sous un niveau d'aération élevé et par la présence de H₂O₂ (Mostertz et al., 2004; Pedersen et al., 2008). Ce mode de régulation original de *L. garvieae* pourrait être en lien avec une régulation du métabolisme du peroxyde d'hydrogène plutôt qu'avec la réponse générale au niveau d'aération. En effet, les gènes *ohrR* et *ohrA*, sensibles à la présence de ROS autres que le H₂O₂, sont eux surexprimés sous un niveau d'aération élevé chez *L. garvieae* de manière comparable à ce qui a déjà été observé chez *L. lactis* ou *B. subtilis* (Mostertz et al., 2004; Pedersen et al., 2008). Ainsi, nous avons proposé que **le contrôle du niveau de H₂O₂ autogène par *L. garvieae* s'effectuerait via les mécanismes de dégradation** plutôt que *via* les mécanismes de synthèse du H₂O₂. En plus de l'importance du niveau d'oxygène disponible, la surexpression de gènes de dégradation du peroxyde d'hydrogène par *L. garvieae* pourrait également jouer un rôle dans la plus faible concentration en H₂O₂ sous un niveau d'aération faible.

Réponse de S. aureus :

Nous avons également caractérisé la réponse moléculaire et physiologique de *S. aureus* à l'antagonisme engendré par la production de H₂O₂ de *L. garvieae*. **L'importance de l'expression des gènes de réponse au H₂O₂ de *S. aureus* (*katA*, *sodA*, *ahpF*) dans la survie de *S. aureus* en présence de H₂O₂ et la réponse à l'antagonisme de *L. garvieae*** a été suggérée. Ce résultat est en adéquation avec plusieurs publications démontrant l'effet positif sur la croissance de *S. aureus* de la fonction de *ahpC* (co-transcrit avec *ahpF*) et *katA* sous aération et présence de ROS (Cosgrove et al., 2007; Maalej et al., 2006) et de *sodA* en condition de stress (Clements et al., 1999). Aux concentrations détectées, l'effet du peroxyde d'hydrogène pourrait être bactéricide ou bactériostatique (Baldry, 1983). La méthode de LIVE/DEAD permettrait de déterminer la nature de cet effet. Cette approche a été entreprise dans ce travail de thèse mais n'a pas donné de résultats exploitables car les deux espèces bactériennes ne pouvaient être distinguées l'une de l'autre au microscope optique (données non montrées). Cette méthode pourrait être optimisée en la combinant à de la cytométrie de flux (rapidité, fiabilité), comme cela a déjà été réalisé avec succès (Berney et al., 2007). Ces analyses devront également être associées à une autre méthode permettant de différencier les

deux espèces : expression de protéines fluorescentes de type GFP (« Green Fluorescent Protein »), séparation des deux populations bactériennes avec une membrane ou des anticorps, etc.

Autres mécanismes moléculaires identifiés potentiellement impliqués dans la relation antagoniste

Répression des gènes de réponse au stress de S. aureus par la présence de L. garvieae et par l'aération :

Ajouté à cela, nos résultats suggèrent que **la répression par *L. garvieae* de plusieurs régulateurs centraux de la réponse au stress oxydatif de *S. aureus* (*dnaK*, *ctsR* et *clpC*) pourrait constituer un second mécanisme d'inhibition**. Appuyant cette hypothèse, l'importance de ces gènes pour la croissance de *S. aureus* en condition de stress, dont l'exposition au H₂O₂, a déjà été observée (Chatterjee et al., 2005; Krüger et al., 1994; Singh et al., 2007). Une répression des gènes *ctsR* et *clpC* de *S. aureus* MW2 a déjà été observée en cas d'exposition longue (une heure ou plus) au peroxyde d'hydrogène (Palazzolo-Ballance et al., 2008). Dans notre étude, la répression de *ctsR*, *clpC* et *dnaK* par *L. garvieae* a été modulée par le niveau d'aération. Ces éléments suggèrent que cette répression pourrait être directement causée par le peroxyde d'hydrogène. Cependant, un effet répresseur similaire de *L. lactis* sur ces gènes a déjà été observé dans des conditions proches de celles utilisées dans ce travail de thèse mais sans production de H₂O₂ (Even et al., 2009), contredisant cette hypothèse. Le rôle du peroxyde d'hydrogène dans cette répression reste donc à éclaircir. Pour ce faire, l'expression de ces gènes devrait être déterminée en co-cultures sous un niveau d'aération élevé mais en absence de H₂O₂ (ajout de catalase).

Répression des gènes de division cellulaire de S. aureus par la présence de L. garvieae :

Un troisième mécanisme d'inhibition via une répression des deux premiers gènes du cluster *dcw* de division cellulaire de *S. aureus*, *mraZ* et *mraW*, en présence de *L. garvieae* a également été proposé. De plus, cette répression pourrait témoigner d'une répression globale des mécanismes de division cellulaire de *S. aureus* (cf. Etude bibliographique). Etant donné que cet effet répresseur est peu modulé par le niveau d'aération, il n'est probablement pas causé par le peroxyde d'hydrogène.

Production d'un autre effecteur extracellulaire par L. garvieae :

Un quatrième mode d'action de *L. garvieae* contre *S. aureus* a été suggéré durant ce travail de thèse. Celui-ci impliquerait un effecteur inhibiteur extracellulaire, différent du H₂O₂, présent dans les co-cultures de *L. garvieae* et *S. aureus* sous un faible niveau d'aération. Cet effecteur agirait durant la phase stationnaire de croissance de *S. aureus*. Cet effecteur n'est pas sensible aux traitements enzymatiques appliqués, pourtant stringents, dégradant les protéines, les lipides et les polysaccharides. Néanmoins, certaines protéines, notamment des bactériocines, sont extrêmement résistants à ce type de traitement. L'hypothèse de la garvieacine Q ne Les conditions de culture excluraient également l'hypothèse d'une compétition nutritionnelle. Les résultats issus du RNA-seq ont permis d'identifier des gènes de *L. garvieae* codant pour des transporteurs dont l'expression était modulée selon le niveau d'aération et la présence ou absence de *S. aureus*. Ceux-ci pourraient être responsables de l'excrétion de cet effecteur inhibiteur. Finalement, plusieurs hypothèses ont été principalement retenues sur la nature de ce nouvel effecteur et devront être testées : l'homéostasie pour un ou plusieurs métaux ou une molécule autre que le H₂O₂ (molécule de signal, de stress ou de quorum sensing). L'inhibition engendrée sur *S. aureus* par la présence de cet effecteur devra également être évaluée sous un niveau d'aération élevé.

Hypothèses de mécanismes impliqués dans la relation antagoniste invalidées au cours de cette étude

En plus des quatre mécanismes identifiés et / ou caractérisés, **ce travail a permis d'exclure deux hypothèses d'effecteurs envisagés dans cet antagonisme.**

L'hypothèse d'un effet inhibiteur de la compétition nutritionnelle pour la thréonine (cf. Etude bibliographique), improbable dans un milieu riche comme le BHI, a été définitivement invalidée dans un milieu limité, le lait microfiltré.

En parallèle, l'analyse des données de RNA-seq et de RT-qPCR a permis de suggérer que *L. garvieae* modulerait le potentiel d'oxydo-réduction en réduisant le O₂ du milieu, comme il a déjà été observé pour *L. lactis* en lait (Jeanson et al., 2009; Tachon et al., 2010). En BHI, nos données suggèrent que les variations de ce potentiel ne seraient pas impliquées dans l'antagonisme de *L. garvieae* vis-à-vis de *S. aureus* sous un faible niveau d'aération en BHI. Néanmoins, le rôle du potentiel redox n'a pas pu être caractérisé en aération. De plus, la

réduction de composés dans une matrice laitière ou fromagère par *L. garvieae* pourrait engendrer une évolution du potentiel redox dans le temps différente de celle observée en BHI.

Modulation de la virulence de *S. aureus* par *L. garvieae* :

Ce travail a permis de mettre en évidence **un effet de *L. garvieae* sur l'expression de gènes de virulence de *S. aureus***, particulièrement intéressant dans le cadre de l'étude de mécanismes de biopréservation. Nous avons en effet observé que *L. garvieae* modulait l'expression d'importants régulateurs de virulence de *S. aureus* (système *agr*, *saeS*, *srrA*, *codY*) en fonction de l'aération et de la souche de *S. aureus*, aboutissant à **une répression des gènes codant pour les entérotoxines C et L à 6 h et 9 h sous un niveau d'aération faible**. Ces résultats pourraient en partie expliquer pourquoi la production d'entérotoxines n'a pas été détectée dans des co-cultures statiques de *S. aureus* SA15 et *L. garvieae* N201 entre 3 h et 24 h d'incubation *in vitro* ou en fromage de type Saint-Nectaire après 48 h d'incubation (Alomar et al., 2008a). Néanmoins, la présence de *L. garvieae* ne suffirait pas à empêcher la production d'entérotoxines par *S. aureus* en phase stationnaire tardive (> 24 h) dans ces conditions (Alomar et al., 2008a). Une étude plus approfondie devrait être menée pour confirmer l'impact négatif de *L. garvieae* sur la production d'entérotoxines par *S. aureus* en matrice alimentaire.

Perspectives générales

L'ensemble de ces résultats a ainsi permis de mieux caractériser l'antagonisme de *L. garvieae* vis-à-vis de *S. aureus* et de suggérer **plusieurs perspectives** d'application de la démarche utilisée lors de ce travail et des résultats obtenus à l'étude d'autres antagonismes et à une éventuelle utilisation de *L. garvieae* en tant qu'agent biopréservateur.

Une démarche adaptable à d'autres contextes

La démarche utilisée lors de ce travail pourrait être adaptée pour étudier d'autres antagonismes entre deux bactéries, voire au sein de communautés microbiennes plus complexes. Combiner des approches génomiques, transcriptomiques et des validations phénotypiques est nécessaire pour avoir une vue d'ensemble des mécanismes impliqués dans une interaction microbienne. Cette démarche pourrait néanmoins être complétée par des

approches protéomiques ou métabolomiques afin d'identifier d'autres molécules inhibitrices produites et d'autres régulations.

La comparaison des profils transcriptomiques bactériens en fonction de paramètres de culture modulant l'inhibition (aération, présence / absence de *S. aureus*, souches différentes de *S. aureus*) **a été particulièrement pertinente pour identifier les mécanismes sous-jacents.** Dans le cas d'une inhibition forte (comme dans notre modèle d'étude), l'approche transcriptomique globale n'est pas réalisable sur l'espèce inhibée en co-culture (concentration cellulaire trop faible, différence de niveau trop élevée entre la population bactérienne antagoniste et la population inhibée). D'autres expérimentations peuvent alors être envisagées. L'identification des effecteurs inhibiteurs et modes d'inhibition peut être réalisée *via* des tests enzymatiques ou encore par analyse protéomique ou métabolomique des surnageants de culture et des extraits cellulaire. La nature de l'antagonisme peut être explorée par observation en microscopie électronique (détermination du contact entre les cellules, observation de la forme des bactéries pour évaluer l'effet de l'inhibition sur la division cellulaire). De plus, si l'inhibition ne requiert pas de contact cellulaire, les expérimentations peuvent être menées en co-cultures avec séparation par une membrane, permettant alors d'isoler chaque population bactérienne. Néanmoins, la démarche méthodologique devra être adaptée à l'interaction antagoniste étudiée en tenant compte du contexte : mode d'inhibition, espèces bactériennes, conditions abiotiques.

*Des données pouvant servir de pistes de compréhension
d'autres relations antagonistes*

Les données issues de ce travail pourraient également servir de piste de compréhension d'autres interactions entre des bactéries lactiques et des microorganismes pathogènes. Bien que les conditions requises soient variables, la plupart des bactéries lactiques sont capables de produire du peroxyde d'hydrogène (Ito et al., 2003; Klebanoff et al., 1991). Ainsi, des parallèles pourraient être réalisés entre le mécanisme moléculaire menant à l'effet antagoniste de *L. garvieae* *via* la production de H₂O₂ et de tels mécanismes concernant d'autres bactéries lactiques. En contexte alimentaire, l'antagonisme d'une bactérie lactique *via* la production de peroxyde d'hydrogène représente un mécanisme innovant, peu décrit jusque-là. L'effet antagoniste d'autres bactéries lactiques d'origine vaginale vis-à-vis de *S. aureus* *via* le H₂O₂ a été plus étudié (Ocaña et al., 1999a, 1999b; Otero and Nader-Macías, 2006). Ocaña et al. (1999b) ont observé que des souches de *Lactobacillus paracasei* subsp.

paracasei produisaient du H₂O₂ de manière comparable à *L. garvieae* N201 *in vitro* : uniquement en aération et avec une évolution de la concentration similaire (indéetectable plusieurs heures, puis pic à ~ 3 mM après ~ 10 h de culture, puis stagnation). La production de peroxyde d'hydrogène par ces souches étant détectée uniquement en présence d'oxygène, leur potentiel protecteur dans l'écosystème vaginal a été supposé comme limité (O'Hanlon et al., 2011). L'hypothèse d'une production de H₂O₂ en milieu anaérobie ou micro-aérobie par des lactobacilles en écosystème vaginal a néanmoins été formulée (Ocaña et al., 1999b). En effet, il a déjà été observé que certains streptocoques pouvaient produire du H₂O₂ en anaérobiose (Ryan and Kleinberg, 1995). Nos résultats démontrent qu'un lactocoque, *L. garvieae* N201, est également capable de produire du peroxyde d'hydrogène à des concentrations suffisantes pour inhiber la croissance de *S. aureus* même dans une condition d'oxygénation faible. **Une meilleure caractérisation des processus inhibiteurs mis en jeu sous un niveau d'aération faible, couplée à un criblage de souches de bactéries lactiques capables de produire de fortes concentrations en H₂O₂ sous faible oxygénation, permettrait d'identifier des souches possédant des capacités protectrices potentiellement applicable en conditions d'anaérobiose ou de micro-aérobiose.**

L. garvieae, une bactérie bioprotectrice potentielle à mieux comprendre

L'analyse de nos données nous a finalement permis de suggérer que la souche *L. garvieae* N201 possédait un potentiel biopréservateur intéressant. En raison de l'ubiquité de *L. garvieae* dans les produits laitiers et de son potentiel biotechnologique (Fernández et al., 2010), cette bactérie pourrait être proposée comme ferment à intérêt technologique et biopréservateur. Puisque cette souche est capable d'inhiber la croissance de souches de *S. aureus* d'origines différentes, comme celles d'autres staphylocoques possédant une coagulase (Delbes-Paus et al., 2010), elle pourrait être testée en tant qu'agent inhibiteur de ce pathogène dans d'autres contextes. Il a été démontré que *L. garvieae* pouvait induire une inhibition de *S. aureus* dans une large gamme de conditions *in vitro* : inoculation de *L. garvieae* allant de 6,0 et 9,0 log (UFC.mL⁻¹), oxygénation faible ou élevée, de 18°C à 34°C, d'un pH 5,0 à 6,8 (Alomar et al., 2008a). De plus, l'acteur principal de cette inhibition est le peroxyde d'hydrogène, un composé inhibiteur à large spectre disposant du statut GRAS (« Generally Recognized As Safe ») et pouvant inhiber d'autres pathogènes plus fortement que *S. aureus* (Alasri et al., 1992).

Cependant, nos données ayant été essentiellement obtenues *in vitro*, elles constituent des pistes de compréhension qui devront nécessairement être confirmées dans la matrice alimentaire concernée dans le cas d'un processus de biopréservation. L'implication du H₂O₂ dans l'antagonisme de *L. garvieae* vis-à-vis de *S. aureus* a également été observée en lait (Delbes-Paus et al., 2010), suggérant que le mécanisme révélé par notre travail serait extrapolable à ce milieu. Néanmoins, une matrice alimentaire est plus complexe qu'un milieu *in vitro*, et peut donc moduler différemment l'antagonisme étudié. Si le peroxyde d'hydrogène joue un rôle en lait, les mécanismes moléculaires sous-jacents identifiés pourraient être différents sur certains points. De plus, la diffusion du H₂O₂ dans le milieu serait probablement diminuée en matrice laitière, particulièrement en milieu solide tel que le fromage. Le lait contient également des enzymes dégradant le peroxyde d'hydrogène et des organismes capables de synthétiser de telles enzymes. A une concentration naturelle en lait, la lactoperoxydase permet de réduire l'inhibition de *S. aureus* engendrée par la présence de *L. garvieae* de ~ 30% (Delbes-Paus et al., 2010). L'éventuelle utilisation du H₂O₂ produit par *L. garvieae* en tant qu'agent biopréservateur nécessiterait donc de mieux caractériser les régulations de son métabolisme en matrice alimentaire et l'effet de cette matrice sur son efficacité inhibitrice intrinsèque (diffusion, dégradation, etc). De plus, les qualités sensorielles de fromages préparés avec *L. garvieae* en tant que ferment devraient être évaluées.

La limite principale à l'utilisation éventuelle de *L. garvieae* en biopréservation réside dans le fait que certaines souches semblent posséder des mécanismes de virulence efficaces contre des espèces aquatiques (Vendrell et al., 2006) et certains rongeurs (Kawanishi et al., 2006; Reimundo et al., 2011). Néanmoins, les souches fromagères, dont la souche N201, ne semblent pas disposer de ces mécanismes. En effet, alors qu'elles sont ingérées en grande concentration depuis des siècles par l'Homme sans problème sanitaire (produits laitiers et autres aliments, cf. étude bibliographique), les infections humaines de *L. garvieae* sont rares et dues à des souches aquatiques au mode d'action supposé opportuniste (Aguado-Urda et al., 2011; Mofredj et al., 2007; Ortiz et al., 2014). **L'étude bibliographique de *L. garvieae* ainsi que l'étude génomique menée sur la souche N201 suggèrent un potentiel de virulence faible ou nul sur l'Homme, et proche de celui de *L. lactis*.** Pourtant, elle ne dispose pas du statut GRAS, contrairement à *L. lactis*. L'identification complète des mécanismes de virulence de *L. garvieae* est donc d'une importance capitale pour prouver la potentielle innocuité de *L. garvieae* pour l'Homme et envisager son utilisation en biopréservation. Si des mécanismes de virulence efficaces sur l'Homme étaient identifiés chez

L. garvieae, les futures recherches devront se concentrer sur des souches de *L. garvieae* ne possédant pas ces mécanismes.

- CONCLUSION -

Les travaux présentés dans cette thèse ont donc permis de mieux caractériser le rôle du peroxyde d'hydrogène dans l'antagonisme de *L. garvieae* vis-à-vis de *S. aureus*, ainsi que de proposer l'implication de trois autres mécanismes : la réponse au stress de *S. aureus*, la division cellulaire de *S. aureus* et l'action d'un effecteur extracellulaire produit par *L. garvieae* dont la nature reste à identifier. La souche de *L. garvieae* N201 semble être une candidate intéressante pour des processus de biopréservation. Cependant, son innocuité pour l'Homme devra être formellement démontrée, son effet sur la virulence de *S. aureus* devra être mieux caractérisé et son antagonisme sur *S. aureus* devra être évalué dans la matrice alimentaire concernée. Les données générées ainsi que la démarche développée pourront être utilisées afin d'étudier des interactions entre d'autres espèces d'intérêt, dans des écosystèmes différents et avec des objectifs de valorisation variés.

REFERENCES

- Abdelnour, A., Arvidson, S., Bremell, T., Rydén, C., Tarkowski, A., 1993. The accessory gene regulator (agr) controls *Staphylococcus aureus* virulence in a murine arthritis model. *Infect. Immun.* 61, 3879–3885.
- Aguado-Urda, M., Gibello, A., Blanco, M. del M., Fernández-Garayzábal, J.F., López-Alonso, V., López-Campos, G.H., 2013. Global transcriptome analysis of *Lactococcus garvieae* strains in response to temperature. *PloS One* 8, e79692.
- Aguado-Urda, M., Gibello, A., Blanco, M.M., López-Campos, G.H., Cutuli, M.T., Fernández-Garayzábal, J.F., 2012. Characterization of plasmids in a human clinical strain of *Lactococcus garvieae*. *PloS One* 7, e40119.
- Aguado-Urda, M., López-Campos, G.H., Blanco, M.M., Fernández-Garayzábal, J.F., Cutuli, M.T., Aspiroz, C., López-Alonso, V., Gibello, A., 2011. Genome sequence of *Lactococcus garvieae* 21881, isolated in a case of human septicemia. *J. Bacteriol.* 193, 4033–4034.
- Aguado-Urda, M., Rodríguez-Bertos, A., de las Heras, A.I., Blanco, M.M., Acosta, F., Cid, R., Fernández-Garayzábal, J.F., Gibello, A., 2014. Experimental *Lactococcus garvieae* infection in zebrafish and first evidence of its ability to invade non-phagocytic cells. *Vet. Microbiol.* 171, 248–254.
- Ahmad, S., Rasool, S.A., 2003. Isolation and biochemical characterization of mutacin VSM43 isolated from human oral *Streptococcus mutans* VSM43. *Pak. J. Pharm. Sci.* 16, 43–50.
- Ahn, B.-E., Cha, J., Lee, E.-J., Han, A.-R., Thompson, C.J., Roe, J.-H., 2006. Nur, a nickel-responsive regulator of the Fur family, regulates superoxide dismutases and nickel transport in *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* 59, 1848–1858.
- Akineden, Ö., Annemüller, C., Hassan, A.A., Lämmle, C., Wolter, W., Zschöck, M., 2001. Toxin Genes and Other Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolates from Milk of Cows with Mastitis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8, 959–964.
- Alasri, A., Roques, C., Michel, G., Cabassud, C., Aptel, P., 1992. Bactericidal properties of peracetic acid and hydrogen peroxide, alone and in combination, and chlorine and formaldehyde against bacterial water strains. *Can. J. Microbiol.* 38, 635–642.
- Aldunate, M., Sbrinovski, D., Hearps, A.C., Latham, C.F., Ramsland, P.A., Gugasyan, R., Cone, R.A., Tachedjian, G., 2015. Antimicrobial and immune modulatory effects of lactic acid and short chain fatty acids produced by vaginal microbiota associated with eubiosis and bacterial vaginosis. *Front. Physiol.* 6, 164.
- Alegria, A., Alvarez-Martín, P., Sacristán, N., Fernández, E., Delgado, S., Mayo, B., 2009. Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casin, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. *Int. J. Food Microbiol.* 136, 44–51.
- Alexopoulos, J.A., Guarné, A., Ortega, J., 2012. ClpP: A structurally dynamic protease regulated by AAA+ proteins. *J. Struct. Biol.* 179, 202–210.
- Almeida, M., Hébert, A., Abraham, A.-L., Rasmussen, S., Monnet, C., Pons, N., Delbès, C., Loux, V., Batto, J.-M., Leonard, P., Kennedy, S., Ehrlich, S.D., Pop, M., Montel, M.-C., Irlinger, F., Renault, P., 2014. Construction of a dairy microbial genome catalog opens new perspectives for the metagenomic analysis of dairy fermented products. *BMC Genomics* 15.
- Alomar, J., 2007. Étude de propriétés physiologiques de *Lactococcus lactis* et de *Lactococcus garvieae* pour la maîtrise de *Staphylococcus aureus* en technologie fromagère. Vandoeuvre-les-Nancy, INPL.
- Alomar, J., Lebert, A., Montel, M.-C., 2008a. Effect of temperature and pH on growth of *Staphylococcus aureus* in co-culture with *Lactococcus garvieae*. *Curr. Microbiol.* 56, 408–412.
- Alomar, J., Loubiere, P., Delbes, C., Nouaille, S., Montel, M.-C., 2008b. Effect of *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecalis* on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in microfiltered milk. *Food Microbiol.* 25, 502–508.
- Amin, V.M., Olson, N.F., 1968. Influence of Catalase Activity on Resistance of Coagulase-positive *Staphylococci* to Hydrogen Peroxide. *Appl. Microbiol.* 16, 267–270.
- Anshary, H., Kurniawan, R.A., Sriwulan, S., Ramli, R., Baxa, D.V., 2014. Isolation and molecular identification of the etiological agents of streptococcosis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in net cages in Lake Sentani, Papua, Indonesia. *Springer Plus* 3, 627.
- Araújo, C., Muñoz-Atienza, E., Nahuelquín, Y., Poeta, P., Igrejas, G., Hernández, P.E., Herranz, C., Cintas, L.M., 2015. Inhibition of fish pathogens by the microbiota from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and rearing environment. *Anaerobe* 32, 7–14.
- Argudín, M.Á., Mendoza, M.C., Rodicio, M.R., 2010. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins* 2, 1751–1773.
- Arief, I.I., Budiman, C., Jenie, B.S.L., Andreas, E., Yuneni, A., 2015. Plantaricin IIA-1A5 from *Lactobacillus plantarum* IIA-1A5 displays bactericidal activity against *Staphylococcus aureus*. *Benef. Microbes* 6, 603–613.
- Armau, J., Sørensen, K.I., Appel, K.F., Vogensen, F.K., Hammer, K., 1996. Analysis of heat shock gene expression in *Lactococcus lactis* MG1363. *Microbiology* 142 (Pt 7), 1685–1691.
- Arrecubieta, C., López, R., García, E., 1994. Molecular characterization of cap3A, a gene from the operon required for the synthesis of the capsule of *Streptococcus pneumoniae* type 3: sequencing of mutations responsible for the unencapsulated phenotype and localization of the capsular cluster on the pneumococcal chromosome. *J. Bacteriol.* 176, 6375–6383.

- Artzatbanov, V.Y., Petrov, V.V., 1990. Branched respiratory chain in aerobically grown *Staphylococcus aureus*—oxidation of ethanol by cells and protoplasts. *Arch. Microbiol.* 153, 580–4.
- Atichartpongkul, S., Fuangthong, M., Vattanaviboon, P., Mongkolsuk, S., 2010. Analyses of the regulatory mechanism and physiological roles of *Pseudomonas aeruginosa* OhrR, a transcription regulator and a sensor of organic hydroperoxides. *J. Bacteriol.* 192, 2093–2101.
- Atichartpongkul, S., Loprasert, S., Vattanaviboon, P., Whangsuk, W., Helmann, J.D., Mongkolsuk, S., 2001. Bacterial Ohr and OsmC paralogues define two protein families with distinct functions and patterns of expression. *Microbiology* 147, 1775–1782.
- Ayala, J.A., Garrido, T., de Pedro, M.A., Vicente, M., 1994. Molecular biology of bacterial septation. JM Ghuysen R Hakenbeck Eds New Compr. Biochem. Bact. Cell Wall Elsevier Publ. Co Lond. 73–101.
- Backes, Y., Gruteke, P., Branger, J., 2015. [*Lactococcus garvieae* endocarditis]. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 159, A8738.
- Baker, H.M., Basu, I., Chung, M.C., Caradoc-Davies, T., Fraser, J.D., Baker, E.N., 2007. Crystal Structures of the Staphylococcal Toxin SSL5 in Complex with Sialyl Lewis X Reveal a Conserved Binding Site that Shares Common Features with Viral and Bacterial Sialic Acid Binding Proteins. *J. Mol. Biol.* 374, 1298–1308.
- Balaban, N., Rasooly, A., 2000. Staphylococcal enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* 61, 1–10.
- Baldry, M.G., 1983. The bactericidal, fungicidal and sporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. *J. Appl. Bacteriol.* 54, 417–423.
- Ballal, A., Manna, A.C., 2010. Control of thioredoxin reductase gene (trxB) transcription by SarA in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 192, 336–345.
- Ballal, A., Manna, A.C., 2009. Regulation of Superoxide Dismutase (sod) Genes by SarA in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 191, 3301–3310.
- Bandyopadhyay, P., Steinman, H.M., 2000. Catalase-peroxidases of *Legionella pneumophila*: cloning of the katA gene and studies of KatA function. *J. Bacteriol.* 182, 6679–6686.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Prijbelski, A.D., Pyshkin, A.V., Sirotkin, A.V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M.A., Pevzner, P.A., 2012. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J. Comput. Biol.* 19, 455–477.
- Barakat, R.K., Griffiths, M.W., Harris, L.J., 2000. Isolation and characterization of *Carnobacterium*, *Lactococcus*, and *Enterococcus* spp. from cooked, modified atmosphere packaged, refrigerated, poultry meat. *Int. J. Food Microbiol.* 62, 83–94.
- Barber, L.E., Deibel, R.H., 1972. Effect of pH and Oxygen Tension on Staphylococcal Growth and Enterotoxin Formation in Fermented Sausage. *Appl. Microbiol.* 24, 891–898.
- Bardoel, B.W., Vos, R., Bouman, T., Aerts, P.C., Bestebroer, J., Huizinga, E.G., Brondijk, T.H.C., van Strijp, J.A.G., Haas, C.J.C. de, 2012. Evasion of Toll-like receptor 2 activation by staphylococcal superantigen-like protein 3. *J. Mol. Med.* 90, 1109–1120.
- Barnes, A.C., Ellis, A.E., 2004. Role of capsule in serotypic differences and complement fixation by *Lactococcus garvieae*. *Fish Shellfish Immunol.* 16, 207–214.
- Bates, E.J., Johnson, C.C., Lowther, D.A., 1985. Inhibition of proteoglycan synthesis by hydrogen peroxide in cultured bovine articular cartilage. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 838, 221–228.
- Bauer, S., Tholen, A., Overmann, J., Brune, A., 2000. Characterization of abundance and diversity of lactic acid bacteria in the hindgut of wood- and soil-feeding termites by molecular and culture-dependent techniques. *Arch. Microbiol.* 173, 126–137.
- Bayer, M.G., Heinrichs, J.H., Cheung, A.L., 1996. The molecular architecture of the sar locus in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 178, 4563–4570.
- Becker, K., Friedrich, A.W., Lubritz, G., Weilert, M., Peters, G., von Eiff, C., 2003. Prevalence of Genes Encoding Pyrogenic Toxin Superantigens and Exfoliative Toxins among Strains of *Staphylococcus aureus* Isolated from Blood and Nasal Specimens. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1434–1439.
- Becker, S.A., Pálsson, B.Ø., 2005. Genome-scale reconstruction of the metabolic network in *Staphylococcus aureus* N315: an initial draft to the two-dimensional annotation. *BMC Microbiol.* 5, 8.
- Bendjeddou, K., Fons, M., Strocker, P., Sadoun, D., 2012. Characterization and purification of a bacteriocin from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BMK2005, an intestinal isolate active against multidrug-resistant pathogens. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 1543–1552.
- Berney, M., Hammes, F., Bosshard, F., Weilenmann, H.-U., Egli, T., 2007. Assessment and Interpretation of Bacterial Viability by Using the LIVE/DEAD BacLight Kit in Combination with Flow Cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3283–3290.
- Besselink, M.G., van Santvoort, H.C., Buskens, E., Boermeester, M.A., van Goor, H., Timmerman, H.M., Nieuwenhuijs, V.B., Bollen, T.L., van Ramshorst, B., Witterman, B.J., Rosman, C., Ploeg, R.J., Brink, M.A., Schaapherder, A.F., Dejong, C.H., Wahab, P.J., van Laarhoven, C.J., van der Harst, E., van Eijck, C.H., Cuesta, M.A., Akkermans, L.M., Gooszen, H.G., 2008. Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet* 371, 651–659.

- Bidaud, P., Hébert, L., Barbey, C., Appourchaux, A.-C., Torelli, R., Sanguinetti, M., Laugier, C., Petry, S., 2012. *Rhodococcus equi*'s extreme resistance to hydrogen peroxide is mainly conferred by one of its four catalase genes. *PloS One* 7, e42396.
- Bidnenko, E., Chopin, A., Ehrlich, S.D., Chopin, M.-C., 2009. Activation of mRNA translation by phage protein and low temperature: the case of *Lactococcus lactis* abortive infection system AbiD1. *BMC Mol. Biol.* 10, 4.
- Blaiotta, G., Fusco, V., Ercolini, D., Pepe, O., Coppola, S., 2010. Diversity of *Staphylococcus* species strains based on partial kat (catalase) gene sequences and design of a PCR-restriction fragment length polymorphism assay for identification and differentiation of coagulase-positive species (*S. aureus*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, and *S. schleiferi* subsp. *coagulans*). *J. Clin. Microbiol.* 48, 192–201.
- Bogovic-Matijasić, B., Rogelj, I., Nes, I.F., Holo, H., 1998. Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49, 606–612.
- Borrero, J., Brede, D.A., Skaugen, M., Diep, D.B., Herranz, C., Nes, I.F., Cintas, L.M., Hernández, P.E., 2011. Characterization of garvicin ML, a novel circular bacteriocin produced by *Lactococcus garvieae* DCC43, isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 369–373.
- Boyle, D.S., Khattar, M.M., Addinall, S.G., Lutkenhaus, J., Donachie, W.D., 1997. *ftsW* is an essential cell-division gene in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 24, 1263–1273.
- Brasca, M., Morandi, S., Lodi, R., Tamburini, A., 2007. Redox potential to discriminate among species of lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1516–1524.
- Bron, P.A., Grangette, C., Mercenier, A., Vos, W.M. de, Kleerebezem, M., 2004. Identification of *Lactobacillus plantarum* Genes That Are Induced in the Gastrointestinal Tract of Mice. *J. Bacteriol.* 186, 5721–5729.
- Bruno-Bárcena, J.M., Azcárate-Peril, M.A., Hassan, H.M., 2010. Role of antioxidant enzymes in bacterial resistance to organic acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 2747–2753.
- Bsat, N., Helmann, J.D., 1999. Interaction of *Bacillus subtilis* Fur (ferric uptake repressor) with the *dhb* operator *in vitro* and *in vivo*. *J. Bacteriol.* 181, 4299–4307.
- Calhoun, M.W., Oden, K.L., Gennis, R.B., Mattos, M.J. de, Neijssel, O.M., 1993. Energetic efficiency of *Escherichia coli*: effects of mutations in components of the aerobic respiratory chain. *J. Bacteriol.* 175, 3020–3025.
- Callon, C., Duthoit, F., Delbès, C., Ferrand, M., Le Frileux, Y., De Crémoux, R., Montel, M.-C., 2007. Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year: molecular approaches. *Syst. Appl. Microbiol.* 30, 547–560.
- Campobasso, N., Patel, M., Wilding, I.E., Kallender, H., Rosenberg, M., Gwynn, M.N., 2004. *Staphylococcus aureus* 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Synthase: crystal structure and mechanism. *J. Biol. Chem.* 279, 44883–44888.
- Capaldi, R.A., Schulenberg, B., Murray, J., Aggeler, R., 2000. Cross-linking and electron microscopy studies of the structure and functioning of the *Escherichia coli* ATP synthase. *J. Exp. Biol.* 203, 29–33.
- Carrión, M., Gómez, M.J., Merchante-Schubert, R., Dongarrá, S., Ayala, J.A., 1999. *mraW*, an essential gene at the *dcw* cluster of *Escherichia coli* codes for a cytoplasmic protein with methyltransferase activity. *Biochimie* 81, 879–888.
- Carvalho, M.G., Vianni, M.C., Elliott, J.A., Reeves, M., Facklam, R.R., Teixeira, L.M., 1997. Molecular analysis of *Lactococcus garvieae* and *Enterococcus gallinarum* isolated from water buffalos with subclinical mastitis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 418, 401–404.
- Casman, E.P., 1965. Staphylococcal Enterotoxin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 128, 124–131.
- Caswell, C.C., Baumgartner, J.E., Martin, D.W., Roop, R.M., 2012. Characterization of the organic hydroperoxide resistance system of *Brucella abortus* 2308. *J. Bacteriol.* 194, 5065–5072.
- Cebrián, G., Sagarzazu, N., Aertsen, A., Pagán, R., Condón, S., Mañas, P., 2009. Role of the alternative sigma factor sigma on *Staphylococcus aureus* resistance to stresses of relevance to food preservation. *J. Appl. Microbiol.* 107, 187–196.
- Chaillou, S., Champomier-Vergès, M.-C., Comet, M., Crutz-Le Coq, A.-M., Dudez, A.-M., Martin, V., Beauflis, S., Darbon-Rongère, E., Bossy, R., Loux, V., Zagorec, M., 2005. The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. *Nat. Biotechnol.* 23, 1527–1533.
- Cha, J. o., Lee, J. k., Jung, Y. h., Yoo, J. i., Park, Y. k., Kim, B. s., Lee, Y. s., 2006. Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolates associated with staphylococcal food poisoning in South Korea. *J. Appl. Microbiol.* 101, 864–871.
- Chang, P., Lin, C., Lee, Y., 2002. *Lactococcus garvieae* infection of cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, in Taiwan and associated biophysical characteristics and histopathology. *Bulletin Eur. Assoc. Fish Pathol.* 22, 319–327.
- Chang, Q., Wang, W., Regev-Yochay, G., Lipsitch, M., Hanage, W.P., 2015. Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be? *Evol. Appl.* 8, 240–247.
- Chang, W., Small, D.A., Toghrol, F., Bentley, W.E., 2006. Global transcriptome analysis of *Staphylococcus aureus* response to hydrogen peroxide. *J. Bacteriol.* 188, 1648–1659.
- Chao, G., Bao, G., Cao, Y., Yan, W., Wang, Y., Zhang, X., Zhou, L., Wu, Y., 2015. Prevalence and diversity of enterotoxin genes with genetic background of *Staphylococcus aureus* isolates from different origins in China. *Int. J. Food Microbiol.* 211, 142–147.
- Charlier, C., Cretenet, M., Even, S., Le Loir, Y., 2009. Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. *Int. J. Food Microbiol.* 131, 30–39.

- Charlier, C., Even, S., Gautier, M., Le Loir, Y., 2008. Acidification is not involved in the early inhibition of *Staphylococcus aureus* growth by *Lactococcus lactis* in milk. *Int. Dairy J.* 18, 197–203.
- Chastanet, A., Fert, J., Msadek, T., 2003. Comparative genomics reveal novel heat shock regulatory mechanisms in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 47, 1061–1073.
- Chastanet, A., Msadek, T., 2003. *clpP* of *Streptococcus salivarius* Is a Novel Member of the Dually Regulated Class of Stress Response Genes in Gram-Positive Bacteria. *J. Bacteriol.* 185, 683–687.
- Chatterjee, I., Becker, P., Grundmeier, M., Bischoff, M., Somerville, G.A., Peters, G., Sinha, B., Harraghy, N., Proctor, R.A., Hermann, M., 2005. *Staphylococcus aureus* ClpC Is Required for Stress Resistance, Aconitase Activity, Growth Recovery, and Death. *J. Bacteriol.* 187, 4488–4496.
- Chatterjee, I., Schmitt, S., Batzilla, C.F., Engelmann, S., Keller, A., Ring, M.W., Kautenburger, R., Ziebuhr, W., Hecker, M., Preissner, K.T., Bischoff, M., Proctor, R.A., Beck, H.P., Lenhof, H.-P., Somerville, G.A., Hermann, M., 2009. *Staphylococcus aureus* ClpC ATPase is a late growth phase effector of metabolism and persistence. *Proteomics* 9, 1152–1176.
- Chen, D.-H., Madan, D., Weaver, J., Lin, Z., Schröder, G.F., Chiu, W., Rye, H.S., 2013. Visualizing GroEL/ES in the Act of Encapsulating a Folding Protein. *Cell* 153, 1354–1365.
- Chen, L., Ge, X., Wang, X., Patel, J.R., Xu, P., 2012. SpxA1 involved in hydrogen peroxide production, stress tolerance and endocarditis virulence in *Streptococcus sanguinis*. *PLoS One* 7, e40034.
- Chen, L., Keramati, L., Helmann, J.D., 1995. Coordinate regulation of *Bacillus subtilis* peroxide stress genes by hydrogen peroxide and metal ions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 8190–8194.
- Chen, S.-C., Liaw, L.-L., Su, H.-Y., Ko, S.-C., Wu, C.-Y., Chaung, H.-C., Tsai, Y.-H., Yang, K.-L., Chen, Y.-C., Chen, T.-H., Lin, G.-R., Cheng, S.-Y., Lin, Y.-D., Lee, J.-L., Lai, C.-C., Weng, Y.-J., Chu, S.-Y., 2002. *Lactococcus garvieae*, a cause of disease in grey mullet, *Mugil cephalus* L., in Taiwan. *J. Fish Dis.* 25, 727–732.
- Chen, S., Lin, Y., Liaw, L., Wang, P., 2001. *Lactococcus garvieae* infection in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. *Dis. Aquat. Organ.* 45, 45–52.
- Cheung, A.L., Bayer, A.S., Zhang, G., Gresham, H., Xiong, Y.-Q., 2004. Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 40, 1–9.
- Cheung, A.L., Nishina, K.A., Pous, M.P.T., Tamber, S., 2008. The SarA protein family of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 355–361.
- Chiang, S.M., Schellhorn, H.E., 2012. Regulators of oxidative stress response genes in *Escherichia coli* and their functional conservation in bacteria. *Arch. Biochem. Biophys.*, Catalases and Hydrogen Peroxide Metabolism 525, 161–169.
- Chiang, Y.-C., Liao, W.-W., Fan, C.-M., Pai, W.-Y., Chiou, C.-S., Tsen, H.-Y., 2008. PCR detection of Staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. *Int. J. Food Microbiol.* 121, 66–73.
- Chuchue, T., Tanboon, W., Prapagdee, B., Dubbs, J.M., Vattanaviboon, P., Mongkolsuk, S., 2006. *ohrR* and *ohr* are the primary sensor/regulator and protective genes against organic hydroperoxide stress in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 188, 842–851.
- Chudobova, D., Dostalova, S., Ruttkay-Nedecky, B., Guran, R., Rodrigo, M.A.M., Tmejova, K., Krizkova, S., Zitka, O., Adam, V., Kizek, R., 2015. The effect of metal ions on *Staphylococcus aureus* revealed by biochemical and mass spectrometric analyses. *Microbiol. Res.* 170, 147–156.
- Chung, M.C., Wines, B.D., Baker, H., Langley, R.J., Baker, E.N., Fraser, J.D., 2007. The crystal structure of staphylococcal superantigen-like protein 11 in complex with sialyl Lewis X reveals the mechanism for cell binding and immune inhibition. *Mol. Microbiol.* 66, 1342–1355.
- Clair, G., Lorphelin, A., Armengaud, J., Duport, C., 2013. OhrRA functions as a redox-responsive system controlling toxinogenesis in *Bacillus cereus*. *J. Proteomics* 94, 527–539.
- Clarke, A.K., 1996. Variations on a theme: Combined molecular chaperone and proteolysis functions in Clp/HSP100 proteins. *J. Biosci.* 21, 161–177.
- Clements, M.O., Watson, S.P., Foster, S.J., 1999. Characterization of the major superoxide dismutase of *Staphylococcus aureus* and its role in starvation survival, stress resistance, and pathogenicity. *J. Bacteriol.* 181, 3898–3903.
- Collins, M.D., Farrow, J.A., Phillips, B.A., Kandler, O., 1983. *Streptococcus garvieae* sp. nov. and *Streptococcus plantarum* sp. nov. *J. Gen. Microbiol.* 129, 3427–3431.
- Collins, M.D., Jones, D., 1981. Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implication. *Microbiol. Rev.* 45, 316–354.
- Colomi, A., Ravelo, C., Romalde, J.L., Toranzo, A.E., Diamant, A., 2003. *Lactococcus garvieae* in wild Red Sea wrasse *Coris aygula* (Labridae). *Dis. Aquat. Organ.* 56, 275–278.
- Condon, S., 1987. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev.* 3, 269–280.
- Corsetti, A., Settanni, L., Chaves López, C., Felis, G.E., Mastrangelo, M., Suzzi, G., 2007. A taxonomic survey of lactic acid bacteria isolated from wheat (*Triticum durum*) kernels and non-conventional flours. *Syst. Appl. Microbiol.* 30, 561–571.
- Corvaglia, E., Bettini, F., Princi, P., Casari, M.C., 1967. [Toxic effect of hydrogen peroxide and lipid peroxidation in erythrocytes in the newborn]. *Riv. Clin. Pediatr.* 80, 638–645.

- Cosgrove, K., Coutts, G., Jonsson, I.-M., Tarkowski, A., Kokai-Kun, J.F., Mond, J.J., Foster, S.J., 2007. Catalase (KatA) and Alkyl Hydroperoxide Reductase (AhpC) Have Compensatory Roles in Peroxide Stress Resistance and Are Required for Survival, Persistence, and Nasal Colonization in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 189, 1025–1035.
- Crater, D.L., Dougherty, B.A., van de Rijn, I., 1995. Molecular characterization of hasC from an operon required for hyaluronic acid synthesis in group A streptococci. Demonstration of UDP-glucose pyrophosphorylase activity. *J. Biol. Chem.* 270, 28676–28680.
- Cretenet, M., Nouaille, S., Thouin, J., Rault, L., Stenz, L., François, P., Hennekinne, J.-A., Piot, M., Maillard, M.B., Fauquant, J., Loubière, P., Loir, Y.L., Even, S., 2011. *Staphylococcus aureus* virulence and metabolism are dramatically affected by *Lactococcus lactis* in cheese matrix. *Environ. Microbiol. Rep.* 3, 340–351.
- Crofts, A.R., Lhee, S., Crofts, S.B., Cheng, J., Rose, S., 2006. Proton pumping in the bc1 complex: a new gating mechanism that prevents short circuits. *Biochim. Biophys. Acta* 1757, 1019–1034.
- Cussiol, J.R.R., Alegria, T.G.P., Szveda, L.I., Netto, L.E.S., 2010. Ohr (organic hydroperoxide resistance protein) possesses a previously undescribed activity, lipoyl-dependent peroxidase. *J. Biol. Chem.* 285, 21943–21950.
- Cussiol, J.R.R., Alves, S.V., de Oliveira, M.A., Netto, L.E.S., 2003. Organic hydroperoxide resistance gene encodes a thiol-dependent peroxidase. *J. Biol. Chem.* 278, 11570–11578.
- Daghistani, H.I., Issa, A.A., Shehabi, A.A., 2000. Frequency of nasal and wound isolates of *Staphylococcus aureus* associated with TSST-1 production in Jordanian population. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 27, 95–98.
- Dahiya, R.S., Speck, M.L., 1968. Hydrogen Peroxide Formation by *Lactobacilli* and Its Effect on *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Sci.* 51, 1568–1572.
- Darmon, E., Noone, D., Masson, A., Bron, S., Kuipers, O.P., Devine, K.M., van Dijk, J.M., 2002. A novel class of heat and secretion stress-responsive genes is controlled by the autoregulated CsrRS two-component system of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 184, 5661–5671.
- da Silva Neto, J.F., Negretto, C.C., Netto, L.E.S., 2012. Analysis of the Organic Hydroperoxide Response of *Chromobacterium violaceum* Reveals That OhrR Is a Cys-Based Redox Sensor Regulated by Thioredoxin. *PLoS ONE* 7.
- Dassy, B., Hogan, T., Foster, T.J., Fournier, J.M., 1993. Involvement of the accessory gene regulator (agr) in expression of type 5 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* 139 Pt 6, 1301–1306.
- Davies, B.W., Köhrer, C., Jacob, A.I., Simmons, L.A., Zhu, J., Aleman, L.M., Rajbhandary, U.L., Walker, G.C., 2010. Role of *Escherichia coli* YbeY, a highly conserved protein, in rRNA processing. *Mol. Microbiol.* 78, 506–518.
- Davies, B.W., Walker, G.C., 2008. A highly conserved protein of unknown function is required by *Sinorhizobium meliloti* for symbiosis and environmental stress protection. *J. Bacteriol.* 190, 1118–1123.
- De Angelis, M., Gobbetti, M., 1999. *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1: manganese, oxygen, superoxide dismutase and metabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 358–363.
- De Buyser, M.L., Dufour, B., Maire, M., Lafarge, V., 2001. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *Int. J. Food Microbiol.* 67, 1–17.
- Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, P., 2006. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* 16, 1058–1071.
- Delbes, C., Alomar, J., Chougui, N., Martin, J.-F., Montel, M.-C., 2006. *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production during the manufacture of uncooked, semihard cheese from cows' raw milk. *J. Food Prot.* 69, 2161–2167.
- Delbes-Paus, C., Dorchie, G., Chaabna, Z., Callon, C., Montel, M.-C., 2010. Contribution of hydrogen peroxide to the inhibition of *Staphylococcus aureus* by *Lactococcus garvieae* in interaction with raw milk microbial community. *Food Microbiol.* 27, 924–932.
- Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.J., Hugenholtz, J., 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie Van Leeuwenhoek* 69, 193–202.
- Deng, X., Liang, H., Ulanovskaya, O.A., Ji, Q., Zhou, T., Sun, F., Lu, Z., Hutchison, A.L., Lan, L., Wu, M., Cravatt, B.F., He, C., 2014. Steady-state hydrogen peroxide induces glycolysis in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 196, 2499–2513.
- Derré, I., Rapoport, G., Msadek, T., 1999. CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls clp and molecular chaperone gene expression in gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 31, 117–131.
- de Souza Lopes, J.L., Hissa, D.C., Melo, V.M.M., Beltramini, L.M., 2013. Interaction of antimicrobial peptide Plantaricin149a and four analogs with lipid bilayers and bacterial membranes. *Braz. J. Microbiol. Publ. Braz. Soc. Microbiol.* 44, 1291–1298.
- De Vliegher, S., Fox, L.K., Piepers, S., McDougall, S., Barkema, H.W., 2012. Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *J. Dairy Sci.* 95, 1025–1040.
- Devriese, L.A., Homme, J., Laevens, H., Pot, B., Vandamme, P., Haesebrouck, F., 1999. Identification of aesculin-hydrolyzing streptococci, lactococci, aerococci and enterococci from subclinical intramammary infections in dairy cows. *Vet. Microbiol.* 70, 87–94.

- Díaz-Mireles, E., Wexler, M., Todd, J.D., Bellini, D., Johnston, A.W.B., Sawers, R.G., 2005. The manganese-responsive repressor Mur of *Rhizobium leguminosarum* is a member of the Fur-superfamily that recognizes an unusual operator sequence. *Microbiol.* 151, 4071–4078.
- Dijkstra, A.R., Alkema, W., Starrenburg, M.J., Hugenoltz, J., van Hijum, S.A., Bron, P.A., 2014. Fermentation-induced variation in heat and oxidative stress phenotypes of *Lactococcus lactis* MG1363 reveals transcriptome signatures for robustness. *Microb. Cell Factories* 13.
- Dinges, M.M., Orwin, P.M., Schlievert, P.M., 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 16–34.
- Dip, P.V., Kamariah, N., Subramanian Manimekalai, M.S., Nartey, W., Balakrishna, A.M., Eisenhaber, F., Eisenhaber, B., Grüber, G., 2014. Structure, mechanism and ensemble formation of the alkylhydroperoxide reductase subunits AhpC and AhpF from *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 70, 2848–2862.
- Doménech, A., Prieta, J., Fernández-Garayzábal, J.F., Collins, M.D., Jones, D., Domínguez, L., 1993. Phenotypic and phylogenetic evidence for a close relationship between *Lactococcus garvieae* and *Enterococcus seriolida*. *Microbiol.* 9, 63–68.
- Dougan, D.A., Mogk, A., Bukau, B., 2002. Protein folding and degradation in bacteria: To degrade or not to degrade? That is the question. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 1607–1616.
- Dougherty, B.A., van de Rijn, I., 1993. Molecular characterization of hasB from an operon required for hyaluronic acid synthesis in group A streptococci. Demonstration of UDP-glucose dehydrogenase activity. *J. Biol. Chem.* 268, 7118–7124.
- Doyle, J.J., Marshall, R.T., Pfander, W.H., 1975. Effects of cadmium on the growth and uptake of cadmium by microorganisms. *Appl. Microbiol.* 29, 562–564.
- Dubbs, J.M., Mongkolsuk, S., 2007. Peroxiredoxins in bacterial antioxidant defense. *Subcell. Biochem.* 44, 143–193.
- Duwat, P., Sourice, S., Cesselin, B., Lamberet, G., Vido, K., Gaudu, P., Le Loir, Y., Violet, F., Loubière, P., Gruss, A., 2001. Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival. *J. Bacteriol.* 183, 4509–4516.
- Egan, A.J.F., Vollmer, W., 2013. The physiology of bacterial cell division. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1277, 8–28.
- Eisen, J.A., Hanawalt, P.C., 1999. A Phylogenomic Study of DNA Repair Genes, Proteins, and Processes. *Mutat. Res.* 435, 171–213.
- El-Baradei, G., Delacroix-Buchet, A., Ogier, J.C., 2008. Bacterial biodiversity of traditional Zabady fermented milk. *Int. J. Food Microbiol.* 121, 295–301.
- Eldar, A., Ghittino, C., 1999. *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: similar, but different diseases. *Dis. Aquat. Organ.* 36, 227–231.
- Eldar, A., Gorla, M., Ghittino, C., Zlotkin, A., Bercovier, H., 1999. Biodiversity of *Lactococcus garvieae* strains isolated from fish in Europe, Asia, and Australia. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1005–1008.
- Elsholz, A.K.W., Gerth, U., Hecker, M., 2010. Regulation of CtsR activity in low GC, Gram+ bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 57, 119–144.
- Elsholz, A.K.W., Hempel, K., Michalik, S., Gronau, K., Becher, D., Hecker, M., Gerth, U., 2011. Activity control of the ClpC adaptor McsB in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 193, 3887–3893.
- Emmett, M., Kloos, W.E., 1975. Amino acid requirements of staphylococci isolated from human skin. *Can. J. Microbiol.* 21, 729–733.
- Endo, H., Higurashi, Y., Okuzumi, K., Hitomi, S., Kimura, S., 2004. Changes in drug susceptibility and toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolated from blood cultures at a university hospital. *J. Infect. Chemother. Off. J. Jpn. Soc. Chemother.* 10, 8–10.
- Engelmann, S., Lindner, C., Hecker, M., 1995. Cloning, nucleotide sequence, and regulation of *katE* encoding a sigma B-dependent catalase in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 177, 5598–5605.
- Eraso, J.M., Markillie, L.M., Mitchell, H.D., Taylor, R.C., Orr, G., Margolin, W., 2014. The Highly Conserved MraZ Protein Is a Transcriptional Regulator in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 196, 2053–2066.
- Erill, I., Campoy, S., Barbé, J., 2007. Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response. *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 637–656.
- Evans, J.J., Pasnik, D.J., Klesius, P.H., Al-Ablani, S., 2006. First report of *Streptococcus agalactiae* and *Lactococcus garvieae* from a wild bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J. Wildl. Dis.* 42, 561–569.
- Even, S., Charlier, C., Nouaille, S., Ben Zakour, N.L., Cretenet, M., Cousin, F.J., Gautier, M., Coccagn-Bousquet, M., Loubière, P., Le Loir, Y., 2009. *Staphylococcus aureus* virulence expression is impaired by *Lactococcus lactis* in mixed cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 4459–4472.
- Eyngor, M., Zlotkin, A., Ghittino, C., Prearo, M., Douet, D.-G., Chilmoneczyk, S., Eldar, A., 2004. Clonality and Diversity of the Fish Pathogen *Lactococcus garvieae* in Mediterranean Countries. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5132–5137.
- Faller, A.H., Götz, F., Schleifer, K.-H., 1980. Cytochrome-patterns of Staphylococci and Micrococci and their taxonomic implications. *Zentralblatt Für Bakteriologie. Mikrobiol. Hyg.* 1, 26–39.
- Farr, S.B., Kogoma, T., 1991. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.* 55, 561–585.

- Faulkner, M.J., Ma, Z., Fuangthong, M., Helmann, J.D., 2012. Derepression of the *Bacillus subtilis* PerR peroxide stress response leads to iron deficiency. *J. Bacteriol.* 194, 1226–1235.
- Fefer, J.J., Ratzan, K.R., Sharp, S.E., Saiz, E., 1998. *Lactococcus garvieae* endocarditis: report of a case and review of the literature. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 32, 127–130.
- Feng, J., Michalik, S., Varming, A.N., Andersen, J.H., Albrecht, D., Jelsbak, L., Krieger, S., Ohlsen, K., Hecker, M., Gerth, U., Ingmer, H., Frees, D., 2013. Trapping and proteomic identification of cellular substrates of the ClpP protease in *Staphylococcus aureus*. *J. Proteome Res.* 12, 547–558.
- Fernández, E., Alegría, Á., Delgado, S., Mayo, B., 2010. Phenotypic, genetic and technological characterization of *Lactococcus garvieae* strains isolated from a raw milk cheese. *Int. Dairy J.* 20, 142–148.
- Ferrario, C., Ricci, G., Milani, C., Lugli, G.A., Ventura, M., Eracilo, G., Borgo, F., Fortina, M.G., 2013. *Lactococcus garvieae*: Where Is It From? A First Approach to Explore the Evolutionary History of This Emerging Pathogen. *PLoS ONE* 8, e84796.
- Fiocco, D., Capozzi, V., Collins, M., Gallone, A., Hols, P., Guzzo, J., Weidmann, S., Rieu, A., Msadek, T., Spano, G., 2010. Characterization of the CtsR Stress Response Regulon in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 192, 896–900.
- Flórez, A.B., Mayo, B., 2015. The Plasmid Complement of the Cheese Isolate *Lactococcus garvieae* IPLA 31405 Revealed Adaptation to the Dairy Environment. *PLoS One* 10, e0126101.
- Flórez, A.B., Mayo, B., 2006. Microbial diversity and succession during the manufacture and ripening of traditional, Spanish, blue-veined Cabrales cheese, as determined by PCR-DGGE. *Int. J. Food Microbiol.* 110, 165–171.
- Flórez, A.B., Reimundo, P., Delgado, S., Fernández, E., Alegría, Á., Guijarro, J.A., Mayo, B., 2012. Genome Sequence of *Lactococcus garvieae* IPLA 31405, a Bacteriocin-Producing, Tetracycline-Resistant Strain Isolated from a Raw-Milk Cheese. *J. Bacteriol.* 194, 5118–5119.
- Fontenelle, C., Blanco, C., Arrieta, M., Dufour, V., Trautwetter, A., 2011. Resistance to organic hydroperoxides requires ohr and ohrR genes in *Sinorhizobium meliloti*. *BMC Microbiol.* 11, 100.
- Fortina, M.G., Ricci, G., Foschino, R., Picozzi, C., Dolci, P., Zeppa, G., Cocolin, L., Manachini, P.L., 2007. Phenotypic typing, technological properties and safety aspects of *Lactococcus garvieae* strains from dairy environments. *J. Appl. Microbiol.* 103, 445–453.
- Fournier, B., Klier, A., Rapoport, G., 2001. The two-component system ArlS-ArlR is a regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 41, 247–261.
- Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P., 2004. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Major Cheese Groups*. Academic Press.
- Frees, D., Chastanet, A., Qazi, S., Sørensen, K., Hill, P., Msadek, T., Ingmer, H., 2004. Clp ATPases are required for stress tolerance, intracellular replication and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 54, 1445–1462.
- Frees, D., Gerth, U., Ingmer, H., 2014. Clp chaperones and proteases are central in stress survival, virulence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 304, 142–149.
- Frees, D., Ingmer, H., 1999. ClpP participates in the degradation of misfolded protein in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* 31, 79–87.
- Frees, D., Savijoki, K., Varmanen, P., Ingmer, H., 2007. Clp ATPases and ClpP proteolytic complexes regulate vital biological processes in low GC, Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 63, 1285–1295.
- Frees, D., Vogensen, F.K., Ingmer, H., 2003. Identification of proteins induced at low pH in *Lactococcus lactis*. *Int. J. Food Microbiol.* 87, 293–300.
- Frerman, F.E., White, D.C., 1967. Membrane Lipid Changes During Formation of a Functional Electron Transport System in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 94, 1868–1874.
- Fridovich, I., 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J. Exp. Biol.* 201, 1203–1209.
- Fuangthong, M., Atichartpongkul, S., Mongkolsuk, S., Helmann, J.D., 2001. OhrR is a repressor of *ohrA*, a key organic hydroperoxide resistance determinant in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 183, 4134–4141.
- Fuangthong, M., Herbig, A.F., Bsat, N., Helmann, J.D., 2002. Regulation of the *Bacillus subtilis* *fur* and *perR* genes by PerR: not all members of the PerR regulon are peroxide inducible. *J. Bacteriol.* 184, 3276–3286.
- Fuchs, S., Pane-Farre, J., Kohler, C., Hecker, M., Engelmann, S., 2007. Anaerobic Gene Expression in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 189, 4275–4289.
- Fuchs, S., Zühlke, D., Pané-Farré, J., Kusch, H., Wolf, C., Reiß, S., Binh, L.T.N., Albrecht, D., Riedel, K., Hecker, M., Engelmann, S., 2013. Aureolib - a proteome signature library: towards an understanding of *Staphylococcus aureus* pathophysiology. *PLoS One* 8, e70669.
- Gaballa, A., Helmann, J.D., 1998. Identification of a zinc-specific metalloregulatory protein, Zur, controlling zinc transport operons in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 180, 5815–5821.
- Gabrielsen, C., Brede, D.A., Hernández, P.E., Nes, I.F., Diep, D.B., 2012. Genome sequence of the bacteriocin-producing strain *Lactococcus garvieae* DCC43. *J. Bacteriol.* 194, 6976–6977.
- Gabrielsen, C., Brede, D.A., Salehian, Z., Nes, I.F., Diep, D.B., 2014. Functional genetic analysis of the GarML gene cluster in *Lactococcus garvieae* DCC43 gives new insights into circular bacteriocin biosynthesis. *J. Bacteriol.* 196, 911–919.

- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R.L., Omar, N.B., 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 120, 51–70.
- Gaskill, M.E., Khan, S.A., 1988. Regulation of the enterotoxin B gene in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 263, 6276–6280.
- Genevaux, P., Georgopoulos, C., Kelley, W.L., 2007. The Hsp70 chaperone machines of *Escherichia coli*: a paradigm for the repartition of chaperone functions. *Mol. Microbiol.* 66, 840–857.
- Georgieva, R., Yocheva, L., Tserovska, L., Zhelezova, G., Stefanova, N., Atanasova, A., Danguleva, A., Ivanova, G., Karapetkov, N., Rumyan, N., Karaivanova, E., 2015. Antimicrobial activity and antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. intended for use as starter and probiotic cultures. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 29, 84–91.
- Gerth, U., Krüger, E., Derré, I., Msadek, T., Hecker, M., 1998. Stress induction of the *Bacillus subtilis clpP* gene encoding a homologue of the proteolytic component of the Clp protease and the involvement of ClpP and ClpX in stress tolerance. *Mol. Microbiol.* 28, 787–802.
- Gilliland, S.E., Speck, M.L., 1974. Antagonism of Lactic Streptococci Toward *Staphylococcus aureus* in Associative Milk Cultures. *Appl. Microbiol.* 28, 1090–1093.
- Giraud, A.T., Rampone, H., Calzolari, A., Nagel, R., 1996. Phenotypic characterization and virulence of a *sae- agr-* mutant of *Staphylococcus aureus*. *Can. J. Microbiol.* 42, 120–123.
- Gleason, F.K., Holmgren, A., 1988. Thioredoxin and related proteins in procaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 4, 271–297.
- Goerke, C., Fluckiger, U., Steinhuber, A., Bisanzio, V., Ulrich, M., Bischoff, M., Patti, J.M., Wolz, C., 2005. Role of *Staphylococcus aureus* Global Regulators *sae* and σB in Virulence Gene Expression during Device-Related Infection. *Infect. Immun.* 73, 3415–3421.
- Gogol, E.P., 1994. Electron microscopy of the F1F0 ATP synthase: from structure to function. *Microsc. Res. Tech.* 27, 294–306.
- Gómez-Lucía, E., Goyache, J., Orden, J.A., Domenech, A., Javier Hernandez, F., Ruiz-Santa Quiteria, J.A., Lopez, B., Blanco, J.L., Suárez, G., 1992. Growth of *Staphylococcus aureus* and Synthesis of Enterotoxin During Ripening of Experimental Manchego-Type Cheese. *J. Dairy Sci.* 75, 19–26.
- Gottesman, S., 2003. Proteolysis in bacterial regulatory circuits. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19, 565–587.
- Gottesman, S., Clark, W.P., de Crecy-Lagard, V., Maurizi, M.R., 1993. ClpX, an alternative subunit for the ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. Sequence and in vivo activities. *J. Biol. Chem.* 268, 22618–22626.
- Götz, F., Mayer, S., 2013. Both Terminal Oxidases Contribute to Fitness and Virulence during Organ-Specific *Staphylococcus aureus* Colonization. *mBio* 4, e00976–13.
- Grallert, H., Buchner, J., 2001. Review: A Structural View of the GroE Chaperone Cycle. *J. Struct. Biol.* 135, 95–103.
- Granata, A., Pennarola, R., 1970. [Toxic effect of hydrogen peroxide on blood cells]. *Arch. Mal. Prof. Médecine Trav. Sécurité Soc.* 31, 107–116.
- Guglielmetti, E., Korhonen, J.M., Heikkinen, J., Morelli, L., von Wright, A., 2009. Transfer of plasmid-mediated resistance to tetracycline in pathogenic bacteria from fish and aquaculture environments. *FEMS Microbiol. Lett.* 293, 28–34.
- Haeghebaert, S., Le Querrec, F., Gallay, A., Bouvet, P., Gomez, M., Vaillant, V., 2002. Les toxi-infections alimentaires collectives en France, en 1999 et 2000. *Bull. Épidémiologique Hebd.* 23, 105–109.
- Haines, W.C., Harmon, L.G., 1973a. Effect of variations in conditions of incubation upon inhibition of *Staphylococcus aureus* by *Pediococcus cerevisiae* and *Streptococcus lactis*. *Appl. Microbiol.* 25, 169–172.
- Haines, W.C., Harmon, L.G., 1973b. Effect of selected lactic acid bacteria on growth of *Staphylococcus aureus* and production of enterotoxin. *Appl. Microbiol.* 25, 436–441.
- Hammer, N.D., Reniere, M.L., Cassat, J.E., Zhang, Y., Hirsch, A.O., Hood, M.I., Skaar, E.P., 2013. Two Heme-Dependent Terminal Oxidases Power *Staphylococcus aureus* Organ-Specific Colonization of the Vertebrate Host. *mBio* 4, e00241–13.
- Handke, L.D., Hawkins, J.C., Miller, A.A., Jansen, K.U., Anderson, A.S., 2013. Regulation of *Staphylococcus aureus* MntC expression and its role in response to oxidative stress. *PloS One* 8, e77874.
- Handley, R.A., Mulholland, F., Reuter, M., Ramachandran, V.K., Musk, H., Clissold, L., Le Brun, N.E., van Vliet, A.H.M., 2015. PerR controls oxidative stress defence and aerotolerance, but not motility-associated phenotypes of *Campylobacter jejuni*. *Microbiology*.
- Hanks, C.T., Fat, J.C., Wataha, J.C., Corcoran, J.F., 1993. Cytotoxicity and Dentin Permeability of Carbamide Peroxide and Hydrogen Peroxide Vital Bleaching Materials, in vitro. *J. Dent. Res.* 72, 931–938.
- Hara, H., Yasuda, S., Horiuchi, K., Park, J.T., 1997. A promoter for the first nine genes of the *Escherichia coli* *mra* cluster of cell division and cell envelope biosynthesis genes, including *ftsI* and *ftsW*. *J. Bacteriol.* 179, 5802–5811.
- Harbury, H.A., Loach, P.A., 1959. Linked functions in heme systems: oxidation-reduction potentials and absorption spectra of a heme peptide obtained upon peptic hydrolysis of cytochrome c. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 45, 1344–1359.
- Heinemann, M., Kümmel, A., Ruinatscha, R., Panke, S., 2005. In silico genome-scale reconstruction and validation of the *Staphylococcus aureus* metabolic network. *Biotechnol. Bioeng.* 92, 850–864.

- Hengge-Aronis, R., 2002. Signal Transduction and Regulatory Mechanisms Involved in Control of the σ S (RpoS) Subunit of RNA Polymerase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 373–395.
- Henkel, S.G., Beek, A.T., Steinsiek, S., Stagge, S., Bettenbrock, K., de Mattos, M.J.T., Sauter, T., Sawodny, O., Ederer, M., 2014. Basic Regulatory Principles of *Escherichia coli*'s Electron Transport Chain for Varying Oxygen Conditions. *PLoS ONE* 9, e107640.
- Hennekinne, J.-A., Buyser, M.-L.D., Dragacci, S., 2012. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 815–836.
- Heras Cañas, V., Pérez Ramirez, M.D., Bermudez Jiménez, F., Rojo Martin, M.D., Miranda Casas, C., Marin Arriaza, M., Navarro Marí, J.M., 2015. *Lactococcus garvieae* endocarditis in a native valve identified by MALDI-TOF MS and PCR-based 16s rRNA in Spain: A case report. *New Microbes New Infect.* 5, 13–15.
- Higuchi, M., Yamamoto, Y., Kamio, Y., 2000. Molecular biology of oxygen tolerance in lactic acid bacteria: Functions of NADH oxidases and Dpr in oxidative stress. *J. Biosci. Bioeng.* 90, 484–493.
- Hirt, R.P., Müller, S., Martin Embley, T., Coombs, G.H., 2002. The diversity and evolution of thioredoxin reductase: new perspectives. *Trends Parasitol.* 18, 302–308.
- Hoffmann, A., Bukau, B., Kramer, G., 2010. Structure and function of the molecular chaperone Trigger Factor. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res., Molecular Chaperones and Intracellular Protein Transport* 1803, 650–661.
- Holmgren, A., 1989. Thioredoxin and Glutaredoxin Systems. *J. Biol. Chem.* 264, 13963–13966.
- Hong, M., Fuangthong, M., Helmann, J.D., Brennan, R.G., 2005. Structure of an OhrR-ohrA operator complex reveals the DNA binding mechanism of the MarR family. *Mol. Cell* 20, 131–141.
- Horsburgh, M.J., Clements, M.O., Crossley, H., Ingham, E., Foster, S.J., 2001a. PerR controls oxidative stress resistance and iron storage proteins and is required for virulence in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 69, 3744–3754.
- Horsburgh, M.J., Ingham, E., Foster, S.J., 2001b. In *Staphylococcus aureus*, fur is an interactive regulator with PerR, contributes to virulence, and is necessary for oxidative stress resistance through positive regulation of catalase and iron homeostasis. *J. Bacteriol.* 183, 468–475.
- Hoskins, J.R., Singh, S.K., Maurizi, M.R., Wickner, S., 2000. Protein binding and unfolding by the chaperone ClpA and degradation by the protease ClpAP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 8892–8897.
- Hoskins, J.R., Yanagihara, K., Mizuuchi, K., Wickner, S., 2002. ClpAP and ClpXP degrade proteins with tags located in the interior of the primary sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 11037–11042.
- Hsieh, F.-C., Chen, C.-T., Weng, Y.-T., Peng, S.-S., Chen, Y.-C., Huang, L.-Y., Hu, H.-T., Wu, Y.-L., Lin, N.-C., Wu, W.-F., 2011. Stepwise activity of ClpY (HslU) mutants in the processive degradation of *Escherichia coli* ClpYQ (HslUV) protease substrates. *J. Bacteriol.* 193, 5465–5476.
- Huang, E., Zhang, L., Chung, Y.-K., Zheng, Z., Yousef, A.E., 2013. Characterization and application of enterocin RM6, a bacteriocin from *Enterococcus faecalis*. *BioMed Res. Int.* 2013, 206917.
- Iandolo, J.J., Clark, C.W., Bluhm, L., Ordal, Z.J., 1965. Repression of *Staphylococcus aureus* in Associative Culture. *Appl. Microbiol.* 13, 646–649.
- Iandolo, J.J., Ordal, Z.J., Witter, L.D., 1964. The effect of incubation temperature and controlled pH on the growth of *Staphylococcus aureus* MF 31 at various concentrations of NaCl. *Can. J. Microbiol.* 10, 808–811.
- Iehata, S., Valenzuela, F., Riquelme, C., 2015. Analysis of bacterial community and bacterial nutritional enzyme activity associated with the digestive tract of wild Chilean octopus (*Octopus mimus* Gould, 1852). *Aquac. Res.* 46, 861–873.
- Ilbert, M., Horst, J., Ahrens, S., Winter, J., Graf, P.C.F., Lilie, H., Jakob, U., 2007. The redox-switch domain of Hsp33 functions as dual stress sensor. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 556–563.
- Imlay, J.A., Chin, S.M., Linn, S., 1988. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science* 240, 640–642.
- Ito, A., Sato, Y., Kudo, S., Sato, S., Nakajima, H., Toba, T., 2003. The Screening of Hydrogen Peroxide-Producing Lactic Acid Bacteria and Their Application to Inactivating Psychrotrophic Food-Borne Pathogens. *Curr. Microbiol.* 47, 0231–0236.
- Itoh, S., Hamada, E., Kamoshida, G., Yokoyama, R., Takii, T., Onozaki, K., Tsuji, T., 2010. Staphylococcal superantigen-like protein 10 (SSL10) binds to human immunoglobulin G (IgG) and inhibits complement activation via the classical pathway. *Mol. Immunol.* 47, 932–938.
- Jakob, U., Muse, W., Eser, M., Bardwell, J.C.A., 1999. Chaperone Activity with a Redox Switch. *Cell* 96, 341–352.
- Janzon, L., Arvidson, S., 1990. The role of the delta-lysin gene (hld) in the regulation of virulence genes by the accessory gene regulator (agr) in *Staphylococcus aureus*. *EMBO J.* 9, 1391–1399.
- Jeanson, S., Hilgert, N., Coquillard, M.-O., Seukpanya, C., Faiveley, M., Neveu, P., Abraham, C., Georgescu, V., Fourcassé, P., Beuvier, E., 2009. Milk acidification by *Lactococcus lactis* is improved by decreasing the level of dissolved oxygen rather than decreasing redox potential in the milk prior to inoculation. *Int. J. Food Microbiol.* 131, 75–81.
- Jena, P.K., Trivedi, D., Chaudhary, H., Sahoo, T.K., Seshadri, S., 2013. Bacteriocin PJ4 active against enteric pathogen produced by *Lactobacillus helveticus* PJ4 isolated from gut microflora of wistar rat (*Rattus norvegicus*): partial purification and characterization of bacteriocin. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 169, 2088–2100.

- Jimenez, J.C., Federle, M.J., 2014. Quorum sensing in group A *Streptococcus*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4, 127.
- Jokovic, N., Nikolic, M., Begovic, J., Jovcic, B., Savic, D., Topisirovic, L., 2008. A survey of the lactic acid bacteria isolated from Serbian artisanal dairy product kajmak. *Int. J. Food Microbiol.* 127, 305–311.
- Jönsson, T.J., Ellis, H.R., Poole, L.B., 2007. Cysteine reactivity and thiol-disulfide interchange pathways in AhpF and AhpC of the bacterial alkyl hydroperoxide reductase system. *Biochemistry* 46, 5709–5721.
- Kain, J., He, G.G., Losick, R., 2008. Polar localization and compartmentalization of ClpP proteases during growth and sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 190, 6749–6757.
- Kajfasz, J.K., Rivera-Ramos, I., Scott-Anne, K., Gregoire, S., Abranches, J., Lemos, J.A., 2015. Transcription of Oxidative Stress Genes Is Directly Activated by SpxA1 and, to a Lesser Extent, by SpxA2 in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* 197, 2160–2170.
- Kang, J.H., Lee, M.S., 2005. Characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* GM-1 isolated from an infant. *J. Appl. Microbiol.* 98, 1169–1176.
- Kao, C.T., Frazier, W.C., 1966. Effect of lactic acid bacteria on growth of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.* 14, 251–255.
- Karahan, M., Açik, M.N., Cetinkaya, B., 2009. Investigation of toxin genes by polymerase chain reaction in *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Turkey. *Foodborne Pathog. Dis.* 6, 1029–1035.
- Karavolos, M.H., Horsburgh, M.J., Ingham, E., Foster, S.J., 2003. Role and regulation of the superoxide dismutases of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Read. Engl.* 149, 2749–2758.
- Katayama, T., Kubota, T., Takata, M., Akimitsu, N., Sekimizu, K., 1996. Disruption of the hslU Gene, Which Encodes an ATPase Subunit of the Eukaryotic 26S Proteasome Homolog in *Escherichia coli*, Suppresses the Temperature-Sensitive dnaA46 Mutation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229, 219–224.
- Kawanishi, M., Yoshida, T., Kijima, M., Yagyu, K., Nakai, T., Okada, S., Endo, A., Murakami, M., Suzuki, S., Morita, H., 2007. Characterization of *Lactococcus garvieae* isolated from radish and broccoli sprouts that exhibited a KG+ phenotype, lack of virulence and absence of a capsule. *Lett. Appl. Microbiol.* 44, 481–487.
- Kawanishi, M., Yoshida, T., Yagashiro, S., Kijima, M., Yagyu, K., Nakai, T., Murakami, M., Morita, H., Suzuki, S., 2006. Differences between *Lactococcus garvieae* isolated from the genus *Seriola* in Japan and those isolated from other animals (trout, terrestrial animals from Europe) with regard to pathogenicity, phage susceptibility and genetic characterization. *J. Appl. Microbiol.* 101, 496–504.
- Kawasaki, S., Ishikura, J., Chiba, D., Nishino, T., Niimura, Y., 2004. Purification and characterization of an H₂O-forming NADH oxidase from *Clostridium aminovalericum*: existence of an oxygen-detoxifying enzyme in an obligate anaerobic bacteria. *Arch. Microbiol.* 181, 324–330.
- Kawasaki, S., Satoh, T., Todoroki, M., Niimura, Y., 2009. b-type dihydroorotate dehydrogenase is purified as a H₂O₂-forming NADH oxidase from *Bifidobacterium bifidum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 629–636.
- Kelley, W.L., 2006. Lex marks the spot: the virulent side of SOS and a closer look at the LexA regulon. *Mol. Microbiol.* 62, 1228–1238.
- Kérouanton, A., Hennekinne, J.A., Letertre, C., Petit, L., Chesneau, O., Brisabois, A., De Buyser, M.L., 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *Int. J. Food Microbiol.* 115, 369–375.
- Kessel, M., Maurizi, M.R., Kim, B., Kocsis, E., Trus, B.L., Singh, S.K., Steven, A.C., 1995. Homology in Structural Organization Between *E. coli* ClpAP Protease and the Eukaryotic 26 S Proteasome. *J. Mol. Biol.* 250, 587–594.
- Kim, J.H., Go, J., Cho, C.R., Kim, J.I., Lee, M.S., Park, S.C., 2013. First report of human acute acalculous cholecystitis caused by the fish pathogen *Lactococcus garvieae*. *J. Clin. Microbiol.* 51, 712–714.
- Kim, Y.I., Levchenko, I., Fraczowska, K., Woodruff, R.V., Sauer, R.T., Baker, T.A., 2001. Molecular determinants of complex formation between Clp/Hsp100 ATPases and the ClpP peptidase. *Nat. Struct. Biol.* 8, 230–233.
- Kimura, S., Suzuki, T., 2010. Fine-tuning of the ribosomal decoding center by conserved methyl-modifications in the *Escherichia coli* 16S rRNA. *Nucleic Acids Res.* 38, 1341–1352.
- King, K.Y., Horenstein, J.A., Caparon, M.G., 2000. Aerotolerance and peroxide resistance in peroxidase and PerR mutants of *Streptococcus pyogenes*. *J. Bacteriol.* 182, 5290–5299.
- Kirstein, J., Zühlke, D., Gerth, U., Turgay, K., Hecker, M., 2005. A tyrosine kinase and its activator control the activity of the CtsR heat shock repressor in *B. subtilis*. *EMBO J.* 24, 3435–3445.
- Klebanoff, S.J., Hillier, S.L., Eschenbach, D.A., Waltersdorph, A.M., 1991. Control of the Microbial Flora of the Vagina by H₂O₂-Generating Lactobacilli. *J. Infect. Dis.* 164, 94–100.
- Klomsiri, C., Panmanee, W., Dharmsthiti, S., Vattanaviboon, P., Mongkolsuk, S., 2005. Novel Roles of ohrR-ohr in *Xanthomonas* Sensing, Metabolism, and Physiological Adaptive Response to Lipid Hydroperoxide. *J. Bacteriol.* 187, 3277–3281.
- Kluytmans, J. a. J.W., Wertheim, H.F.L., 2005. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and prevention of nosocomial infections. *Infection* 33, 3–8.
- Kock, H., Gerth, U., Hecker, M., 2004. MurAA, catalysing the first committed step in peptidoglycan biosynthesis, is a target of Clp-dependent proteolysis in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 51, 1087–1102.

- Koenig, S., Marth, E.H., 1982. Behavior of *Staphylococcus aureus* in Cheddar Cheese Made with Sodium Chloride or a Mixture of Sodium Chloride and Potassium Chloride. *J. Food Prot.* 45, 996–1002.
- Koopman, W.J.H., Nijtmans, L.G.J., Dieteren, C.E.J., Roestenberg, P., Valsecchi, F., Smeitink, J.A.M., Willems, P.H.G.M., 2009. Mammalian Mitochondrial Complex I: Biogenesis, Regulation, and Reactive Oxygen Species Generation. *Antioxid. Redox Signal.* 12, 1431–1470.
- Krüger, E., Hecker, M., 1998. The First Gene of the *Bacillus subtilis* *clpC* Operon, *ctsR*, Encodes a Negative Regulator of Its Own Operon and Other Class III Heat Shock Genes. *J. Bacteriol.* 180, 6681–6688.
- Krüger, E., Msadek, T., Hecker, M., 1996. Alternate promoters direct stress-induced transcription of the *Bacillus subtilis* *clpC* operon. *Mol. Microbiol.* 20, 713–723.
- Krüger, E., Völker, U., Hecker, M., 1994. Stress induction of *clpC* in *Bacillus subtilis* and its involvement in stress tolerance. *J. Bacteriol.* 176, 3360–3367.
- Krüger, E., Zühlke, D., Witt, E., Ludwig, H., Hecker, M., 2001. Clp-mediated proteolysis in Gram-positive bacteria is autoregulated by the stability of a repressor. *EMBO J.* 20, 852–863.
- Kuroda, M., Kobayashi, D., Honda, K., Hayashi, H., Ohta, T., 1999. The *hsp* operons are repressed by the *hrc37* of the *hsp70* operon in *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Immunol.* 43, 19–27.
- Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Cui, L., Oguchi, A., Aoki, K., Nagai, Y., Lian, J., Ito, T., Kanamori, M., Matsumaru, H., Maruyama, A., Murakami, H., Hosoyama, A., Mizutani-Ui, Y., Takahashi, N.K., Sawano, T., Inoue, R., Kaito, C., Sekimizu, K., Hirakawa, H., Kuhara, S., Goto, S., Yabuzaki, J., Kanehisa, M., Yamashita, A., Oshima, K., Furuya, K., Yoshino, C., Shiba, T., Hattori, M., Ogasawara, N., Hayashi, H., Hiramatsu, K., 2001. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet* 357, 1225–1240.
- Kusuda, R., Kawai, K., Salati, F., Banner, C.R., Fryer, J.L., 1991. *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41, 406–409.
- Kuwana, R., Yamamoto, N., 2012. Increases in GroES and GroEL from *Lactobacillus acidophilus* L-92 in response to a decrease in medium pH, and changes in cytokine release from splenocytes: Transcriptome and proteome analyses. *J. Biosci. Bioeng.* 114, 9–16.
- Kwaadsteniet, M. de, Doeschate, K. ten, Dicks, L.M.T., 2008. Characterization of the Structural Gene Encoding Nisin F, a New Lantibiotic Produced by a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Isolate from Freshwater Catfish (*Clarias gariepinus*). *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 547–549.
- Langley, R., Wines, B., Willoughby, N., Basu, I., Proft, T., Fraser, J.D., 2005. The Staphylococcal Superantigen-Like Protein 7 Binds IgA and Complement C5 and Inhibits IgA-FcαRI Binding and Serum Killing of Bacteria. *J. Immunol.* 174, 2926–2933.
- Laverty, G., Gorman, S.P., Gilmore, B.F., 2014. Biomolecular Mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* Biofilm Formation. *Pathog. Basel Switz.* 3, 596–632.
- LeBel, G., Vaillancourt, K., Frenette, M., Gottschalk, M., Grenier, D., 2014. Suicin 90-1330 from a nonvirulent strain of *Streptococcus suis*: a nisin-related lantibiotic active on gram-positive swine pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 5484–5492.
- Lee, J.-S., Heo, Y.-J., Lee, J.K., Cho, Y.-H., 2005. KatA, the major catalase, is critical for osmoprotection and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Infect. Immun.* 73, 4399–4403.
- Lee, J.-W., Helmann, J.D., 2007. Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. *BioMetals* 20.
- Lee, J.-W., Helmann, J.D., 2006. The PerR transcription factor senses H₂O₂ by metal-catalysed histidine oxidation. *Nature* 440, 363–367.
- Lee, N.-K., Han, E.J., Han, K.J., Paik, H.-D., 2013. Antimicrobial effect of bacteriocin KU24 produced by *Lactococcus lactis* KU24 against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Food Sci.* 78, M465–469.
- Le Loir, Y., Baron, F., Gautier, M., 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet. Mol. Res.* GMR 2, 63–76.
- Lemos, J.A.C., Burne, R.A., 2002. Regulation and Physiological Significance of ClpC and ClpP in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* 184, 6357–6366.
- Lesniak, J., Barton, W.A., Nikolov, D.B., 2003. Structural and functional features of the *Escherichia coli* hydroperoxide resistance protein OsmC. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 12, 2838–2843.
- Lesniak, J., Barton, W.A., Nikolov, D.B., 2002. Structural and functional characterization of the *Pseudomonas* hydroperoxide resistance protein Ohr. *EMBO J.* 21, 6649–6659.
- Liang, X., Yu, C., Sun, J., Liu, H., Landwehr, C., Holmes, D., Ji, Y., 2006. Inactivation of a two-component signal transduction system, SaeRS, eliminates adherence and attenuates virulence of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 74, 4655–4665.
- Lincoln, R.A., Leigh, J.A., Jones, N.C., 1995. The amino acid requirements of *Staphylococcus aureus* isolated from cases of bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 45, 275–279.
- Li, N., Luo, Q., Jiang, Y., Wu, G., Gao, H., 2014. Managing oxidative stresses in *Shewanella oneidensis*: intertwined roles of the OxyR and OhrR regulons. *Environ. Microbiol.* 16, 1821–1834.

- Lin, Y.-H., Chen, Y.-S., Wu, H.-C., Pan, S.-F., Yu, B., Chiang, C.-M., Chiu, C.-M., Yanagida, F., 2013. Screening and characterization of LAB-produced bacteriocin-like substances from the intestine of grey mullet (*Mugil cephalus* L.) as potential biocontrol agents in aquaculture. *J. Appl. Microbiol.* 114, 299–307.
- Li, S.-J., Hu, D.-L., Maina, E. K., Shinagawa, K., Omoe, K., Nakane, A., 2011. Superantigenic activity of toxic shock syndrome toxin-1 is resistant to heating and digestive enzymes. *J. Appl. Microbiol.* 110, 729–736.
- Liu, J., Huang, C., Shin, D.-H., Yokota, H., Jancarik, J., Kim, J.-S., Adams, P.D., Kim, R., Kim, S.-H., 2005. Crystal structure of a heat-inducible transcriptional repressor HrcA from *Thermotoga maritima*: structural insight into DNA binding and dimerization. *J. Mol. Biol.* 350, 987–996.
- Liu, M.A., Kwong, S.M., Jensen, S.O., Brzoska, A.J., Firth, N., 2013. Biology of the staphylococcal conjugative multiresistance plasmid pSK41. *Plasmid* 70, 42–51.
- Liu, X., Vederas, J.C., Whittall, R.M., Zheng, J., Stiles, M.E., Carlson, D., Franz, C.M.A.P., McMullen, L.M., van Belkum, M.J., 2011. Identification of an N-terminal formylated, two-peptide bacteriocin from *Enterococcus faecalis* 710C. *J. Agric. Food Chem.* 59, 5602–5608.
- Liu, Y., Wu, N., Dong, J., Gao, Y., Zhang, X., Mu, C., Shao, N., Yang, G., 2010. Hfq is a global regulator that controls the pathogenicity of *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 5.
- Li, Y., 1996. Biological properties of peroxide-containing tooth whiteners. *Food Chem. Toxicol.* 34, 887–904.
- Lockridge, O., Massey, V., Sullivan, P.A., 1972. Mechanism of Action of the Flavoenzyme Lactate Oxidase. *J. Biol. Chem.* 247, 8097–8106.
- Loi, V.V., Rossius, M., Antelmann, H., 2015. Redox regulation by reversible protein S-thiolation in bacteria. *Front. Microbiol.* 6, 187.
- Lopez de Felipe, F., Gaudu, P., 2009. Multiple control of the acetate pathway in *Lactococcus lactis* under aeration by catabolite repression and metabolites. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 1115–1122.
- Lorquet, F., Goffin, P., Muscarello, L., Baudry, J.-B., Ladero, V., Sacco, M., Kleerebezem, M., Hols, P., 2004. Characterization and Functional Analysis of the poxB Gene, Which Encodes Pyruvate Oxidase in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 186, 3749–3759.
- Lu, J., Holmgren, A., 2014. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic. Biol. Med.* 66, 75–87.
- Maalej, S., Dammak, I., Dukan, S., 2006. The impairment of superoxide dismutase coordinates the derepression of the PerR regulon in the response of *Staphylococcus aureus* to HOCl stress. *Microbiology* 152, 855–861.
- Madinabeitia, I., Ohtsuka, S., Okuda, J., Iwamoto, E., Yoshida, T., Furukawa, M., Nakaoka, N., Nakai, T., 2009. Homogeneity among *Lactococcus garvieae* isolates from striped jack, *Pseudocaranx dentex* (Bloch & Schneider), and its ectoparasites. *J. Fish Dis.* 32, 901–905.
- Maeda-Yorita, K., Aki, K., Sagai, H., Misaki, H., Massey, V., 1995. L-lactate oxidase and L-lactate monooxygenase: Mechanistic variations on a common structural theme. *Biochimie* 77, 631–642.
- Magoč, T., Salzberg, S.L., 2011. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* 27, 2957–2963.
- Majerczyk, C.D., Sadykov, M.R., Luong, T.T., Lee, C., Somerville, G.A., Sonenshein, A.L., 2008. *Staphylococcus aureus* CodY Negatively Regulates Virulence Gene Expression. *J. Bacteriol.* 190, 2257–2265.
- Maki, T., Santos, M.D., Kondo, H., Hirano, I., Aoki, T., 2009. A transferable 20-kilobase multiple drug resistance-conferring R plasmid (pKL0018) from a fish pathogen (*Lactococcus garvieae*) is highly homologous to a conjugative multiple drug resistance-conferring enterococcal plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 3370–3372.
- Maldonado-Barragán, A., Cárdenas, N., Martínez, B., Ruiz-Barba, J.L., Fernández-Garayzábal, J.F., Rodríguez, J.M., Gibello, A., 2013. Garvicin A, a novel class Ild bacteriocin from *Lactococcus garvieae* that inhibits septum formation in *L. garvieae* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 4336–4346.
- Mandell, G.L., 1975. Catalase, superoxide dismutase, and virulence of *Staphylococcus aureus*. In vitro and in vivo studies with emphasis on staphylococcal-leukocyte interaction. *J. Clin. Invest.* 55, 561–566.
- Manna, A.C., Cheung, A.L., 2006. Expression of SarX, a Negative Regulator of *agr* and Exoprotein Synthesis, Is Activated by MgrA in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 188, 4288–4299.
- Margis, R., Dunand, C., Teixeira, F.K., Margis-Pinheiro, M., 2008. Glutathione peroxidase family – an evolutionary overview. *FEBS J.* 275, 3959–3970.
- Martin-Visscher, L.A., van Belkum, M.J., Gameau-Tsodikova, S., Whittall, R.M., Zheng, J., McMullen, L.M., Vederas, J.C., 2008. Isolation and Characterization of Carnocyclin A, a Novel Circular Bacteriocin Produced by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4756–4763.
- Massey, V., Strickland, S., Mayhew, S.G., Howell, L.G., Engel, P.C., Matthews, R.G., Schuman, M., Sullivan, P.A., 1969. The production of superoxide anion radicals in the reaction of reduced flavins and flavoproteins with molecular oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 36, 891–897.
- McGrew, D.A., Knight, K.L., 2003. Molecular Design and Functional Organization of the RecA Protein. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 38, 385–432.
- McLaughlin, R.W., Cochran, P.A., Dowd, S.E., 2014. Isolation of *Lactococcus garvieae* strain TRF1 from the fecal material of a Timber Rattlesnake. *Curr. Microbiol.* 69, 63–68.

- Medvedová, A., Valík, L., 2012. *Staphylococcus aureus*: Characterisation and Quantitative Growth Description in Milk and Artisanal Raw Milk Cheese Production, in: Amer Eissa, A., Structure and Function of Food Engineering. InTech.
- Mengin-Lecreux, D., Ayala, J., Bouhss, A., van Heijenoort, J., Parquet, C., Hara, H., 1998. Contribution of the P_{mra} Promoter to Expression of Genes in the *Escherichia coli* mra Cluster of Cell Envelope Biosynthesis and Cell Division Genes. J. Bacteriol. 180, 4406–4412.
- Messina, C.G.M., Reeves, E.P., Roes, J., Segal, A.W., 2002. Catalase negative *Staphylococcus aureus* retain virulence in mouse model of chronic granulomatous disease. FEBS Lett. 518, 107–110.
- Messner, K.R., Imlay, J.A., 1999. The Identification of Primary Sites of Superoxide and Hydrogen Peroxide Formation in the Aerobic Respiratory Chain and Sulfite Reductase Complex of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 274, 10119–10128.
- Metaxopoulos, J., Genigeorgis, C., Fanelli, M.J., Franti, C., Cosma, E., 1981. Production of Italian Dry Salami: Effect of Starter Culture and Chemical Acidulation on Staphylococcal Growth in Salami Under Commercial Manufacturing Conditions. Appl. Environ. Microbiol. 42, 863–871.
- Meury, J., Kohiyama, M., 1991. Role of heat shock protein DnaK in osmotic adaptation of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 173, 4404–4410.
- Meyrand, A., Boutrand-Loei, S., Ray-Gueniot, S., Mazuy, C., Gaspard, C.E., Jaubert, G., Perrin, G., Lapeyre, C., Vemozy-Rozand, C., 1998. Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Camembert-type cheeses from raw goats' milk. J. Appl. Microbiol. 85, 537–544.
- Miller, R.D., Fung, D.Y.C., 1973. Amino Acid Requirements for the Production of Enterotoxin B by *Staphylococcus aureus* S-6 in a Chemically Defined Medium. Appl. Microbiol. 25, 800–806.
- Mills, S.A., Marletta, M.A., 2005. Metal Binding Characteristics and Role of Iron Oxidation in the Ferric Uptake Regulator from *Escherichia coli*. Biochemistry 44, 13553–13559.
- Mingorance, J., Tamames, J., Vicente, M., 2004. Genomic channeling in bacterial cell division. J. Mol. Recognit. 17, 481–487.
- Minor, T.E., Marth, E.H., 1970. Growth of *Staphylococcus aureus* in acidified pasteurized milk. J. Milk Food Technol. 33, 516–20.
- Mishra, S., Imlay, J., 2012. Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide? Arch. Biochem. Biophys. 525, 145–160.
- Missiakas, D., Schwager, F., Betton, J.M., Georgopoulos, C., Raina, S., 1996. Identification and characterization of HslV HslU (ClpQ ClpY) proteins involved in overall proteolysis of misfolded proteins in *Escherichia coli*. EMBO J. 15, 6899–6909.
- Miyauchi, E., Toh, H., Nakano, A., Tanabe, S., Morita, H., 2012. Comparative Genomic Analysis of *Lactococcus garvieae* Strains Isolated from Different Sources Reveals Candidate Virulence Genes. Int. J. Microbiol. 2012, e728276.
- Miyoshi, A., Rochat, T., Gratadoux, J.-J., Le Loir, Y., Oliveira, S.C., Langella, P., Azevedo, V., 2003. Oxidative stress in *Lactococcus lactis*. Genet. Mol. Res. GMR 2, 348–359.
- Mkrtchyan, H., Gibbons, S., Heidelberg, S., Zloh, M., Limaki, H.K., 2010. Purification, characterisation and identification of acidocin LCHV, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus acidophilus* n.v. Er 317/402 strain Narine. Int. J. Antimicrob. Agents 35, 255–260.
- Mofredj, A., Bahloul, H., Chanut, C., 2007. *Lactococcus lactis*: un pathogène opportuniste ? Médecine Mal. Infect. 37, 200–207.
- Mogk, A., Homuth, G., Scholz, C., Kim, L., Schmid, F.X., Schumann, W., 1997. The GroE chaperonin machine is a major modulator of the CIRCE heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. EMBO J. 16, 4579–4590.
- Monfredini, L., Settanni, L., Poznanski, E., Cavazza, A., Franciosi, E., 2012. The spatial distribution of bacteria in Grana-cheese during ripening. Syst. Appl. Microbiol. 35, 54–63.
- Mongkolsuk, S., Praituan, W., Loprasert, S., Fuangthong, M., Chamnongpol, S., 1998. Identification and characterization of a new organic hydroperoxide resistance (ohr) gene with a novel pattern of oxidative stress regulation from *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. J. Bacteriol. 180, 2636–2643.
- Moore, C.M., Hermann, J.D., 2005. Metal ion homeostasis in *Bacillus subtilis*. Curr. Opin. Microbiol., Cell Regulation 8, 188–195.
- Morandi, S., Silvetti, T., Miranda Lopez, J. m., Brasca, M., 2015. Antimicrobial Activity, Antibiotic Resistance and the Safety of Lactic Acid Bacteria in Raw Milk Valtellina Casera Cheese. J. Food Saf. 35, 193–205.
- Morita, H., Toh, H., Oshima, K., Yoshizaki, M., Kawanishi, M., Nakaya, K., Suzuki, T., Miyauchi, E., Ishii, Y., Tanabe, S., Murakami, M., Hattori, M., 2011. Complete genome sequence and comparative analysis of the fish pathogen *Lactococcus garvieae*. PloS One 6, e23184.
- Morton, R.K., Sturtevant, J.M., 1964. Kinetic Investigations of Yeast L-Lactate Dehydrogenase (Cytochrome b₂). I. The dehydrogenation of L-lactate in the presence and absence of ferricyanide as electron acceptor. J. Biol. Chem. 239, 1614–1624.
- Mostertz, J., Scharf, C., Hecker, M., Homuth, G., 2004. Transcriptome and proteome analysis of *Bacillus subtilis* gene expression in response to superoxide and peroxide stress. Microbiology 150, 497–512.

- Murphy, M.G., Condon, S., 1984. Correlation of oxygen utilization and hydrogen peroxide accumulation with oxygen induced enzymes in *Lactobacillus plantarum* cultures. Arch. Microbiol. 138, 44–48.
- Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L., Pfaller, M.A., Tenover, R.H., 2003. Manual of Clinical Microbiology (8th edition). Herdon, VA, United States of America: American Society for Microbiology.
- Nagao, M., Okamoto, A., Yamada, K., Hasegawa, T., Hasegawa, Y., Ohta, M., 2009. Variations in amount of TSST-1 produced by clinical methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates and allelic variation in accessory gene regulator (*agr*) locus. BMC Microbiol. 9, 52.
- Nagarajan, V., Elasm, M.O., 2007. SAMMD: *Staphylococcus aureus* microarray meta-database. BMC Genomics 8, 351.
- Nair, S., Poyart, C., Beretti, J.-L., Veiga-Fernandes, H., Berche, P., Trieu-Cuot, P., 2003. Role of the *Streptococcus agalactiae* ClpP serine protease in heat-induced stress defence and growth arrest. Microbiol. Read. Engl. 149, 407–417.
- Nakano, S., Küster-Schöck, E., Grossman, A.D., Zuber, P., 2003a. Spx-dependent global transcriptional control is induced by thiol-specific oxidative stress in *Bacillus subtilis*. Proc. Natl. Acad. Sci. 100, 13603–13608.
- Nakano, S., Nakano, M.M., Zhang, Y., Leelakriangsak, M., Zuber, P., 2003b. A regulatory protein that interferes with activator-stimulated transcription in bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. 100, 4233–4238.
- Nakano, S., Zheng, G., Nakano, M.M., Zuber, P., 2002. Multiple pathways of Spx (YjbD) proteolysis in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 184, 3664–3670.
- Nakoneczna, J., Michta, E., Rybicka, M., Grinholc, M., Gwizdek-Wisniewska, A., Bielawski, K.P., 2010. Superoxide dismutase is upregulated in *Staphylococcus aureus* following protoporphyrin-mediated photodynamic inactivation and does not directly influence the response to photodynamic treatment. BMC Microbiol. 10, 323.
- Newberry, K.J., Fuangthong, M., Panmanee, W., Mongkolsuk, S., Brennan, R.G., 2007. Structural mechanism of organic hydroperoxide induction of the transcription regulator OhrR. Mol. Cell 28, 652–664.
- Niven, D.F., Ekins, A., al-Samaurai, A.A., 1999. Effects of iron and manganese availability on growth and production of superoxide dismutase by *Streptococcus suis*. Can. J. Microbiol. 45, 1027–1032.
- Nouaille, S., Even, S., Charlier, C., Le Loir, Y., Coccagn-Bousquet, M., Loubière, P., 2009. Transcriptomic response of *Lactococcus lactis* in mixed culture with *Staphylococcus aureus*. Appl. Environ. Microbiol. 75, 4473–4482.
- Nouaille, S., Rault, L., Jeanson, S., Loubière, P., Le Loir, Y., Even, S., 2014. Contribution of *Lactococcus lactis* reducing properties to the downregulation of a major virulence regulator in *Staphylococcus aureus*, the *agr* system. Appl. Environ. Microbiol.
- Novick, R.P., Jiang, D., 2003. The staphylococcal *saeRS* system coordinates environmental signals with *agr* quorum sensing. Microbiology 149, 2709–2717.
- Ocaña, V.S., Nader-Macias, M.E., Pesce de Ruiz Holgado, A.A., 1999a. Selection of vaginal H₂O₂-generating *Lactobacillus* species for probiotic use. Curr. Microbiol. 38, 279–284.
- Ocaña, V.S., Pesce de Ruiz Holgado, A.A., Nader-Macias, M.E., 1999b. Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* isolated from the human vagina. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 23, 87–92.
- Ochsner, U.A., Hassett, D.J., Vasil, M.L., 2001. Genetic and Physiological Characterization of ohr, Encoding a Protein Involved in Organic Hydroperoxide Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 183, 773–778.
- Oganesyan, V., Busso, D., Brandsen, J., Chen, S., Jancarik, J., Kim, R., Kim, S.-H., 2003. Structure of the hypothetical protein AQ_1354 from *Aquifex aeolicus*. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 59, 1219–1223.
- Ogston, A., 1882. Micrococcus poisoning. J. Anat. Physiol.
- O'Hanlon, D.E., Moench, T.R., Cone, R.A., 2011. In vaginal fluid, bacteria associated with bacterial vaginosis can be suppressed with lactic acid but not hydrogen peroxide. BMC Infect. Dis. 11, 200.
- Ohnishi, T., Nakamaru-Ogiso, E., Ohnishi, S.T., 2010. A new hypothesis on the simultaneous direct and indirect proton pump mechanisms in NADH-quinone oxidoreductase (complex I). FEBS Lett. 584, 4131–4137.
- Oh, S.-Y., Shin, J.-H., Roe, J.-H., 2007. Dual role of OhrR as a repressor and an activator in response to organic hydroperoxides in *Streptomyces coelicolor*. J. Bacteriol. 189, 6284–6292.
- Oliveira, M.A., Guimarães, B.G., Cussiol, J.R.R., Medrano, F.J., Gozzo, F.C., Netto, L.E.S., 2006. Structural insights into enzyme-substrate interaction and characterization of enzymatic intermediates of organic hydroperoxide resistance protein from *Xylella fastidiosa*. J. Mol. Biol. 359, 433–445.
- Ölmez, H., Kretschmar, U., 2009. Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. LWT - Food Sci. Technol. 42, 686–693.
- Onoue, Y., Mori, M., 1997. Amino acid requirements for the growth and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* in chemically defined media. Int. J. Food Microbiol. 36, 77–82.
- O'Riordan, K., Lee, J.C., 2004. *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharides. Clin. Microbiol. Rev. 17, 218–234.
- Ortiz, C., López, J., Del Amo, E., Sevilla, T., García, P.E., San Román, J.A., 2014. *Lactococcus garvieae* infective endocarditis: report of 2 cases and review of the literature. Rev. Esp. Cardiol. Engl. Ed 67, 776–778.
- O'Shea, E.F., O'Connor, P.M., O'Sullivan, O., Cotter, P.D., Ross, R.P., Hill, C., 2013. Bactofencin A, a new type of cationic bacteriocin with unusual immunity. mBio 4, e00498–00413.

- Otero, M.C., Nader-Macías, M.E., 2006. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 96, 35–46.
- Outten, C.E., O'Halloran, T.V., 2001. Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science* 292, 2488–2492.
- Palacios, M.A., Zamora, M.J., Velazquez, J., Zamora, E., Duran, A., 1993. Streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Spain. *Boll. Soc. Ital. Patol. Ittica* 5, 11–16.
- Palazzolo-Ballance, A.M., Reniere, M.L., Braughton, K.R., Sturdevant, D.E., Otto, M., Kreiswirth, B.N., Skaar, E.P., DeLeo, F.R., 2008. Neutrophil microbicides induce a pathogen survival response in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 180, 500–509.
- Pallen, M.J., Wren, B.W., 1997. The HtrA family of serine proteases. *Mol. Microbiol.* 26, 209–221.
- Pangallo, D., Saková, N., Koreňová, J., Puškárová, A., Kraková, L., Valík, L., Kuchta, T., 2014. Microbial diversity and dynamics during the production of May bryndza cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 170, 38–43.
- Panmanee, W., Vattanaviboon, P., Eiamphungporn, W., Whangsuk, W., Sallabhan, R., Mongkolsuk, S., 2002. OhrR, a transcription repressor that senses and responds to changes in organic peroxide levels in *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Mol. Microbiol.* 45, 1647–1654.
- Pan, Q., Losick, R., 2003. Unique degradation signal for ClpCP in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 185, 5275–5278.
- Papa, S., Capitanio, N., Glaser, P., Villani, G., 1994. The proton pump of heme-copper oxidases. *Cell Biol. Int.* 18, 345–355.
- Patton, T.G., Rice, K.C., Foster, M.K., Bayles, K.W., 2005. The *Staphylococcus aureus* cidC gene encodes a pyruvate oxidase that affects acetate metabolism and cell death in stationary phase. *Mol. Microbiol.* 56, 1664–1674.
- Pedersen, M.B., Garrigues, C., Tuphile, K., Brun, C., Vido, K., Bennedsen, M., Møllgaard, H., Gaudu, P., Gruss, A., 2008. Impact of aeration and heme-activated respiration on *Lactococcus lactis* gene expression: identification of a heme-responsive operon. *J. Bacteriol.* 190, 4903–4911.
- Penhoat, C.H. du, Li, Z., Atreya, H.S., Kim, S., Yee, A., Xiao, R., Murray, D., Arrowsmith, C.H., Szyperski, T., 2005. NMR solution structure of Thermotoga maritima protein TM1509 reveals a Zn-metalloprotease-like tertiary structure. *J. Struct. Funct. Genomics* 6, 51–62.
- Pérez-Sánchez, T., Balcázar, J.L., García, Y., Halaihel, N., Vendrell, D., de Blas, I., Merrifield, D.L., Ruiz-Zarzuela, I., 2011. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae*. *J. Fish Dis.* 34, 499–507.
- Petersohn, A., Engelmann, S., Setlow, P., Hecker, M., 1999. The katX gene of *Bacillus subtilis* is under dual control of σ B and σ F. *Mol. Gen. Genet. MGG* 262, 173–179.
- Pfeiler, E.A., Klaenhammer, T.R., 2007. The genomics of lactic acid bacteria. *Trends Microbiol.* 15, 546–553.
- Piard, J.-C., Desmazeaud, M., 1991. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait* 71, 525–541.
- Pieterse, R., Todorov, S.D., Dicks, L.M.T., 2008. Bacteriocin ST91KM, produced by *Streptococcus gallolyticus* subsp. *macedonicus* ST91KM, is a narrow-spectrum peptide active against bacteria associated with mastitis in dairy cattle. *Can. J. Microbiol.* 54, 525–531.
- Pinheiro, T.J., 1994. The interaction of horse heart cytochrome c with phospholipid bilayers. Structural and dynamic effects. *Biochimie* 76, 489–500.
- Pinto, A.C., Melo-Barbosa, H.P., Miyoshi, A., Silva, A., Azevedo, V., 2011. Application of RNA-seq to reveal the transcript profile in bacteria. *Genet. Mol. Res.* 10, 1707–1718.
- Platero, R., de Lorenzo, V., Garat, B., Fabiano, E., 2007. *Sinorhizobium meliloti* fur-like (Mur) protein binds a fur box-like sequence present in the *mntA* promoter in a manganese-responsive manner. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4832–4838.
- Pohl, K., Francois, P., Stenz, L., Schlink, F., Geiger, T., Herbert, S., Goerke, C., Schrenzel, J., Wolz, C., 2009. CodY in *Staphylococcus aureus*: a Regulatory Link between Metabolism and Virulence Gene Expression. *J. Bacteriol.* 191, 2953–2963.
- Poole, L.B., Ellis, H.R., 1996. Flavin-Dependent Alkyl Hydroperoxide Reductase from *Salmonella typhimurium*. *Biochemistry* 35, 56–64.
- Portnoy, V.A., Scott, D.A., Lewis, N.E., Tarasova, Y., Osterman, A.L., Palsson, B.Ø., 2010. Deletion of Genes Encoding Cytochrome Oxidases and Quinol Monooxygenase Blocks the Aerobic-Anaerobic Shift in *Escherichia coli* K-12 MG1655. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 6529–6540.
- Pot, B., Devriese, L.A., Ursi, D., Vandamme, P., Haesebrouck, F., Kersters, K., 1996. Phenotypic identification and differentiation of *Lactococcus* strains isolated from animals. *Syst. Appl. Microbiol.* 19, 213–222.
- Pragman, A.A., Herron-Olson, L., Case, L.C., Vetter, S.M., Henke, E.E., Kapur, V., Schlievert, P.M., 2007a. Sequence analysis of the *Staphylococcus aureus* srrAB loci reveals that truncation of srrA affects growth and virulence factor expression. *J. Bacteriol.* 189, 7515–7519.
- Pragman, A.A., Ji, Y., Schlievert, P.M., 2007b. Repression of *Staphylococcus aureus* SrrAB using inducible antisense srrA alters growth and virulence factor transcript levels. *Biochemistry (Mosc.)* 46, 314–321.

- Pragman, A.A., Yarwood, J.M., Tripp, T.J., Schlievert, P.M., 2004. Characterization of Virulence Factor Regulation by SrrAB, a Two-Component System in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 186, 2430–2438.
- Price, C.W., Fawcett, P., C  r  monie, H., Su, N., Murphy, C.K., Youngman, P., 2001. Genome-wide analysis of the general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 41, 757–774.
- Quatravaux, S., Remize, F., Bryckaert, E., Colavizza, D., Guzzo, J., 2006. Examination of *Lactobacillus plantarum* lactate metabolism side effects in relation to the modulation of aeration parameters. *J. Appl. Microbiol.* 101, 903–912.
- Ramasarma, T., Rasheed, B.K., Vijaya, S., Puranam, R.S., Shivaswamy, V., Gaikwad, A.S., Kurup, C.K., 1992. Functions of cytochrome c in regulation of electron transfer and protein folding. *Indian J. Biochem. Biophys.* 29, 173–178.
- Ramp, W.K., Arnold, R.R., Russell, J.E., Yancey, J.M., 1987. Hydrogen Peroxide Inhibits Glucose Metabolism and Collagen Synthesis in Bone. *J. Periodontol.* 58, 340–344.
- Rantsiou, K., Urso, R., Iacumin, L., Cantoni, C., Cattaneo, P., Comi, G., Cocolin, L., 2005. Culture-Dependent and -Independent Methods To Investigate the Microbial Ecology of Italian Fermented Sausages. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1977–1986.
- Rasouly, A., Ron, E.Z., 2009. Interplay between the heat shock response and translation in *Escherichia coli*. *Res. Microbiol., Bacterial stress responses* 160, 288–296.
- Rasouly, A., Schonbrun, M., Shenhar, Y., Ron, E.Z., 2009. YbeY, a heat shock protein involved in translation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 191, 2649–2655.
- Rea, R., Hill, C., Gahan, C.G.M., 2005. *Listeria monocytogenes* PerR mutants display a small-colony phenotype, increased sensitivity to hydrogen peroxide, and significantly reduced murine virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8314–8322.
- Regassa, L.B., Betley, M.J., 1992. Alkaline pH decreases expression of the accessory gene regulator (agr) in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 174, 5095–5100.
- Regassa, L.B., Novick, R.P., Betley, M.J., 1992. Glucose and nonmaintained pH decrease expression of the accessory gene regulator (agr) in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 60, 3381–3388.
- Reimundo, P., Rivas, A.J., Osorio, C.R., Méndez, J., Pérez-Pascual, D., Navais, R., Gómez, E., Sotelo, M., Lemos, M.L., Guijarro, J.A., 2011. Application of suppressive subtractive hybridization to the identification of genetic differences between two *Lactococcus garvieae* strains showing distinct differences in virulence for rainbow trout and mouse. *Microbiology* 157, 2106–2119.
- Reischl, S., Wiegert, T., Schumann, W., 2002. Isolation and analysis of mutant alleles of the *Bacillus subtilis* HrcA repressor with reduced dependency on GroE function. *J. Biol. Chem.* 277, 32659–32667.
- Reisinger, P., Seidel, H., Tschesche, H., Hammes, W.P., 1980. The effect of nisin on murein synthesis. *Arch. Microbiol.* 127, 187–193.
- Reyes, D., Andrey, D.O., Monod, A., Kelley, W.L., Zhang, G., Cheung, A.L., 2011. Coordinated regulation by AgrA, SarA, and SarR to control agr expression in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 193, 6020–6031.
- Reza  ki, L., Lamberet, G., Derr  , A., Gruss, A., Gaudu, P., 2008. *Lactococcus lactis* produces short-chain quinones that cross-feed Group B Streptococcus to activate respiration growth. *Mol. Microbiol.* 67, 947–957.
- Ricciardi, A., Parente, E., Guidone, A., Ianniello, R.G., Zotta, T., Sayem, S.M.A., Varcamonti, M., 2012. Genotypic diversity of stress response in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum* and *Lactobacillus pentosus*. *Int. J. Food Microbiol.* 157, 278–285.
- Ricci, G., Ferrario, C., Borgo, F., Eracilio, G., Fortina, M.G., 2013. Genome Sequences of Two *Lactococcus garvieae* Strains Isolated from Meat. *Genome Announc.* 1.
- Riley, M.V., Giblin, F.J., 1982. Toxic effects of hydrogen peroxide on corneal endothelium. *Curr. Eye Res.* 2, 451–458.
- Rinc  , A., Giard, J.-C., Pichereau, V., Flahaut, S., Auffray, Y., 2001. Identification and Characterization of ogsp65, an Organic Hydroperoxide Resistance (ohr) Gene Encoding a General Stress Protein in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 183, 1482–1488.
- Robertson, G.T., Ng, W.-L., Foley, J., Gilmour, R., Winkler, M.E., 2002. Global transcriptional analysis of clpP mutations of type 2 Streptococcus pneumoniae and their effects on physiology and virulence. *J. Bacteriol.* 184, 3508–3520.
- Rockabrand, D., Arthur, T., Korinek, G., Livers, K., Blum, P., 1995. An essential role for the *Escherichia coli* DnaK protein in starvation-induced thermotolerance, H₂O₂ resistance, and reductive division. *J. Bacteriol.* 177, 3695–3703.
- Rogasch, K., R  hmling, V., Pan  -Farré, J., H  per, D., Weinberg, C., Fuchs, S., Sch  mde, M., Br  ker, B.M., Wolz, C., Hecker, M., Engelmann, S., 2006. Influence of the two-component system SaeRS on global gene expression in two different *Staphylococcus aureus* strains. *J. Bacteriol.* 188, 7742–7758.
- Rosenbach, A.J., 1884. Microorganismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen. J.F. Bergmann, Wiesbaden. *Bergey* 8, 18.
- Rubin, R., Farber, J.L., 1984. Mechanisms of the killing of cultured hepatocytes by hydrogen peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 228, 450–459.
- Rumjuankiat, K., Perez, R.H., Pilasombut, K., Keawsompong, S., Zendo, T., Sonomoto, K., Nitisinprasert, S., 2015. Purification and characterization of a novel plantaricin, KL-1Y, from *Lactobacillus plantarum* KL-1. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 983–994.

- Ruvolo, M.V., Mach, K.E., Burkholder, W.F., 2006. Proteolysis of the replication checkpoint protein Sda is necessary for the efficient initiation of sporulation after transient replication stress in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 60, 1490–1508.
- Ryan, C.S., Kleinberg, I., 1995. Bacteria in human mouths involved in the production and utilization of hydrogen peroxide. *Arch. Oral Biol.* 40, 753–763.
- Saikolappan, S., Sasindran, S.J., Yu, H.D., Baseman, J.B., Dhandayuthapani, S., 2009. The *Mycoplasma genitalium* MG_454 Gene Product Resists Killing by Organic Hydroperoxides. *J. Bacteriol.* 191, 6675–6682.
- Sanders, J.W., Leenhouts, K.J., Haandrikman, A.J., Venema, G., Kok, J., 1995. Stress response in *Lactococcus lactis*: cloning, expression analysis, and mutation of the lactococcal superoxide dismutase gene. *J. Bacteriol.* 177, 5254–5260.
- Sanz, R., Marín, I., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Orden, J.A., Cid, D., Diez, R.M., Silhadi, K.S., Amils, R., de la Fuente, R., 2000. Catalase deficiency in *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* is associated with natural loss-of-function mutations within the structural gene. *Microbiology* 146 (Pt 2), 465–475.
- Sasaki, Y., Horiuchi, H., Kawashima, H., Mukai, T., Yamamoto, Y., 2014. NADH Oxidase of *Streptococcus thermophilus* 1131 is Required for the Effective Yogurt Fermentation with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038. *Biosci. Microbiota Food Health* 33, 31–40.
- Savijoki, K., Ingmer, H., Frees, D., Vogensen, F.K., Palva, A., Varmanen, P., 2003. Heat and DNA damage induction of the LexA-like regulator HdiR from *Lactococcus lactis* is mediated by RecA and ClpP. *Mol. Microbiol.* 50, 609–621.
- Schägger, H., Pfeiffer, K., 2000. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* 19, 1777–1783.
- Schirmer, E.C., Glover, J.R., Singer, M.A., Lindquist, S., 1996. HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem. Sci.* 21, 289–296.
- Schmid-Hempel, P., Frank, S.A., 2007. Pathogenesis, Virulence, and Infective Dose. *PLoS Pathog* 3, e147.
- Schumacher, M.A., Pearson, R.F., Møller, T., Valentin-Hansen, P., Brennan, R.G., 2002. Structures of the pleiotropic translational regulator Hfq and an Hfq-RNA complex: a bacterial Sm-like protein. *EMBO J.* 21, 3546–3556.
- Schumann, W., 2003. The *Bacillus subtilis* heat shock stimulon. *Cell Stress Chaperones* 8, 207–217.
- Seaver, L.C., Imlay, J.A., 2001. Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183, 7173–7181.
- Seemann, T., 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30, 2068–2069.
- Sequeiros, C., Garcés, M.E., Vallejo, M., Marguet, E.R., Olivera, N.L., 2015. Potential aquaculture probiont *Lactococcus lactis* TW34 produces nisin Z and inhibits the fish pathogen *Lactococcus garvieae*. *Arch. Microbiol.* 197, 449–458.
- Shimizu, A., Fujita, M., Igarashi, H., Takagi, M., Nagase, N., Sasaki, A., Kawano, J., 2000. Characterization of *Staphylococcus aureus* Coagulase Type VII Isolates from Staphylococcal Food Poisoning Outbreaks (1980–1995) in Tokyo, Japan, by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3746–3749.
- Simeão do Carmo, L., Dias, R.S., Linardi, V.R., José de Sena, M., Aparecida dos Santos, D., Eduardo de Faria, M., Pena, E.C., Jett, M., Heneine, L.G., 2002. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiol.* 19, 9–14.
- Simon, R., Scoggin, C., Patterson, D., 1981. Hydrogen peroxide mediates the toxic effect of oxygen radicals on human fibroblasts. *Chest* 80, 45.
- Si, M., Wang, J., Xiao, X., Guan, J., Zhang, Y., Ding, W., Chaudhry, M.T., Wang, Y., Shen, X., 2015. Ohr Protects *Corynebacterium glutamicum* against Organic Hydroperoxide Induced Oxidative Stress. *PLoS ONE* 10, e0131634.
- Singh, V.K., Syring, M., Singh, A., Singhal, K., Dalecki, A., Johansson, T., 2012. An insight into the significance of the DnaK heat shock system in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* 302, 242–252.
- Singh, V.K., Utaida, S., Jackson, L.S., Jayaswal, R.K., Wilkinson, B.J., Chamberlain, N.R., 2007. Role for dnaK locus in tolerance of multiple stresses in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 153, 3162–3173.
- Sip, A., Wieckowicz, M., Olejnik-Schmidt, A., Gardo, A., Gorlas, R., Grajek, W., 2009. Occurrence of lactic acid bacteria with activity against *Listeria* in Polish regional cheeses produced in the Tatrzan-Sko-Beskidzki District. *Acta Sci. Pol. - Biotechnol.* 8, 27–44.
- Sonenshein, A.L., 2005. CodY, a global regulator of stationary phase and virulence in Gram-positive bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 203–207.
- Song, D.-F., Zhu, M.-Y., Gu, Q., 2014. Purification and Characterization of Plantaricin ZJ5, a New Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* ZJ5. *PLoS ONE* 9.
- Soonsanga, S., Lee, J.-W., Helmann, J.D., 2008. Oxidant-dependent switching between reversible and sacrificial oxidation pathways for *Bacillus subtilis* OhrR. *Mol. Microbiol.* 68, 978–986.
- Srinivasan, V., Sawant, A.A., Gillespie, B.E., Headrick, S.J., Ceasar, L., Oliver, S.P., 2006. Prevalence of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolated from milk of cows with mastitis. *Foodborne Pathog. Dis.* 3, 274–283.
- Stackebrandt, E., Teuber, M., 1988. Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70, 317–324.

- Steinhuber, A., Goerke, C., Bayer, M.G., Döring, G., Wolz, C., 2003. Molecular Architecture of the Regulatory Locus *sae* of *Staphylococcus aureus* and Its Impact on Expression of Virulence Factors. *J. Bacteriol.* 185, 6278–6286.
- Stiles, M.E., 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70, 331–345.
- Stolpe, S., Friedrich, T., 2004. The *Escherichia coli* NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) is a primary proton pump but may be capable of secondary sodium antiport. *J. Biol. Chem.* 279, 18377–18383.
- Storz, G., Imlay, J.A., 1999. Oxidative stress. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 188–194.
- Suthammarak, W., Somerlot, B.H., Opheim, E., Sedensky, M., Morgan, P.G., 2013. Novel interactions between mitochondrial superoxide dismutases and the electron transport chain. *Aging Cell* 12, 1132–1140.
- Svetoch, E.A., Eruslanov, B.V., Levchuk, V.P., Perelygin, V.V., Mitsevich, E.V., Mitsevich, I.P., Stepanshin, J., Dyatlov, I., Seal, B.S., Stern, N.J., 2011. Isolation of *Lactobacillus salivarius* 1077 (NRRL B-50053) and characterization of its bacteriocin, including the antimicrobial activity spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2749–2754.
- Taber, H.W., Morrison, M., 1964. Electron Transport in Staphylococci. Properties of a Particle Preparation from Exponential Phase *Staphylococcus aureus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 105, 367–379.
- Tachon, S., Brandsma, J.B., Yvon, M., 2010. NoxE NADH Oxidase and the Electron Transport Chain Are Responsible for the Ability of *Lactococcus lactis* To Decrease the Redox Potential of Milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1311–1319.
- Tachon, S., Michelon, D., Chambellon, E., Cantonnet, M., Mezange, C., Henno, L., Cachon, R., Yvon, M., 2009. Experimental conditions affect the site of tetrazolium violet reduction in the electron transport chain of *Lactococcus lactis*. *Microbiol. Read. Engl.* 155, 2941–2948.
- Taguchi, H., 2015. Reaction Cycle of Chaperonin GroEL via Symmetric “Football” Intermediate. *J. Mol. Biol.*
- Taguchi, H., 2005. Chaperonin GroEL Meets the Substrate Protein as a “Load” of the Rings. *J. Biochem. (Tokyo)* 137, 543–549.
- Tatini, S.R., 1976. Thermal Stability of Enterotoxins in Food. *J. Milk Food Technol. JMFT* 39, 432–438.
- Tatini, S.R., 1973. Influence of Food Environments on Growth of *Staphylococcus aureus* and Production of Various Enterotoxins. *J. Milk Food Technol. JMFT* 36, 559–563.
- Tatini, S.R., Jezeski, J.J., Morris, H.A., Olson Jr., J.C., Casman, E.P., 1971. Production of Staphylococcal Enterotoxin A in Cheddar and Colby Cheeses 1,2,3. *J. Dairy Sci.* 54, 815–825.
- Tatini, S.R., Wesala, W.D., Jezeski, J.J., Morris, H.A., 1973. Production of Staphylococcal Enterotoxin A in Blue, Brick, Mozzarella, and Swiss Cheeses 1,2. *J. Dairy Sci.* 56, 429–435.
- Teixeira, L.M., Merquior, V.L., Vianni, M.C., Carvalho, M.G., Fracalanza, S.E., Steigerwalt, A.G., Brenner, D.J., Facklam, R.R., 1996. Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 664–668.
- Tejedor, J.L., Vela, A.I., Gibello, A., Casamayor, A., Domínguez, L., Fernández-Garayzábal, J.F., 2011. A genetic comparison of pig, cow and trout isolates of *Lactococcus garvieae* by PFGE analysis. *Lett. Appl. Microbiol.* 53, 614–619.
- Thirumalai, D., Lorimer, G.H., 2001. Chaperonin-Mediated Protein Folding. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 30, 245–269.
- Thomas, D., Dauwalder, O., Brun, V., Badiou, C., Ferry, T., Etienne, J., Vandenesch, F., Lina, G., 2009. *Staphylococcus aureus* Superantigens Elicit Redundant and Extensive Human V β Patterns. *Infect. Immun.* 77, 2043–2050.
- Thompson, J., 1988. Lactic acid bacteria: model systems for in vivo studies of sugar transport and metabolism in gram-positive organisms. *Biochimie* 70, 325–336.
- Throup, J.P., Zappacosta, F., Lunsford, R.D., Annan, R.S., Carr, S.A., Lonsdale, J.T., Bryant, A.P., McDevitt, D., Rosenberg, M., Burnham, M.K., 2001. The *srhSR* gene pair from *Staphylococcus aureus*: genomic and proteomic approaches to the identification and characterization of gene function. *Biochemistry* 40, 10392–10401.
- Tilkens, B.L., King, A.M., Glass, K.A., Sindelar, J.J., 2015. Validating the Inhibition of *Staphylococcus aureus* in Shelf-Stable, Ready-to-Eat Snack Sausages with Varying Combinations of pH and Water Activity. *J. Food Prot.* 78, 1215–1220.
- Todd, J., Fishaut, M., Kapral, F., Welch, T., 1978. Toxic-Shock syndrome associated with phage-groupe-I *staphylococci*. *The Lancet* 312, 1116–1118.
- Tosukhowong, A., Zendo, T., Visessanguan, W., Roytrakul, S., Pumpuang, L., Jaresitthikunchai, J., Sonomoto, K., 2012. Garvieacin Q, a novel class II bacteriocin from *Lactococcus garvieae* BCC 43578. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1619–1623.
- Tsur, A., Slutzki, T., Flusser, D., 2014. *Lactococcus garvieae* Endocarditis on a Prosthetic Biological Aortic Valve. *Zoonoses Public Health*.
- Turgay, K., Hahn, J., Burghoom, J., Dubnau, D., 1998. Competence in *Bacillus subtilis* is controlled by regulated proteolysis of a transcription factor. *EMBO J.* 17, 6730–6738.
- Turgay, K., Hamoen, L.W., Venema, G., Dubnau, D., 1997. Biochemical characterization of a molecular switch involving the heat shock protein ClpC, which controls the activity of ComK, the competence transcription factor of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* 11, 119–128.

- Tynecka, Z., Szcześniak, Z., Malm, A., Los, R., 1999. Energy conservation in aerobically grown *Staphylococcus aureus*. Res. Microbiol. 150, 555–566.
- Ullers, R.S., Houben, E.N.G., Raine, A., Hagen-Jongman, C.M. ten, Ehrenberg, M., Brunner, J., Oudega, B., Harms, N., Luijck, J., 2003. Interplay of signal recognition particle and trigger factor at L23 near the nascent chain exit site on the *Escherichia coli* ribosome. J. Cell Biol. 161, 679–684.
- Ulrich, M., Bastian, M., Cramton, S.E., Ziegler, K., Pragman, A.A., Bragonzi, A., Memmi, G., Wolz, C., Schlievert, P.M., Cheung, A., Döring, G., 2007. The staphylococcal respiratory response regulator SrrAB induces ica gene transcription and polysaccharide intercellular adhesin expression, protecting *Staphylococcus aureus* from neutrophil killing under anaerobic growth conditions. Mol. Microbiol. 65, 1276–1287.
- Unden, G., Bongaerts, J., 1997. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg. 1320, 217–234.
- Valderas, M.W., Hart, M.E., 2001. Identification and characterization of a second superoxide dismutase gene (sodM) from *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 183, 3399–3407.
- van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S.D., Maguin, E., 2002. Stress responses in lactic acid bacteria, in: Siezen, R.J., Kok, J., Abee, T., Schasfsma, G. (Eds.), Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications. Springer Netherlands, pp. 187–216.
- Vela, A.I., Vázquez, J., Gibello, A., Blanco, M.M., Moreno, M.A., Liébana, P., Albendea, C., Alcalá, B., Mendez, A., Domínguez, L., Fernández-Garayzábal, J.F., 2000. Phenotypic and Genetic Characterization of *Lactococcus garvieae* Isolated in Spain from Lactococcosis Outbreaks and Comparison with Isolates of Other Countries and Sources. J. Clin. Microbiol. 38, 3791–3795.
- Vendrell, D., Balcázar, J.L., Ruiz-Zarzuela, I., de Blas, I., Gironés, O., Múzquiz, J.L., 2006. *Lactococcus garvieae* in fish: A review. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 29, 177–198.
- Veras, J.F., do Carmo, L.S., Tong, L.C., Shupp, J.W., Cummings, C., Santos, D.A. dos, Cerqueira, M.M.O.P., Cantini, A., Nicoli, J.R., Jett, M., 2008. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. Int. J. Infect. Dis. 12, 410–415.
- Vercruysse, M., Köhrer, C., Davies, B.W., Arnold, M.F.F., Mekalanos, J.J., RajBhandary, U.L., Walker, G.C., 2014. The highly conserved bacterial RNase YbeY is essential in vibrio cholerae, playing a critical role in virulence, stress regulation, and RNA processing. PLoS Pathog. 10, e1004175.
- Vicente, M., Gomez, M.J., Ayala, J.A., 1998. Regulation of transcription of cell division genes in the *Escherichia coli* *dcw* cluster. Cell. Mol. Life Sci. CMLS 54, 317–324.
- Viedma, P.M., Abriouel, H., Omar, N.B., López, R.L., Gálvez, A., 2009. Antistaphylococcal effect of enterocin AS-48 in bakery ingredients of vegetable origin, alone and in combination with selected antimicrobials. J. Food Sci. 74, M384–389.
- Villani, F., Aponte, M., Blaiotta, G., Mauriello, G., Pepe, O., Moschetti, G., 2001. Detection and characterization of a bacteriocin, garviecin L1-5, produced by *Lactococcus garvieae* isolated from raw cow's milk. J. Appl. Microbiol. 90, 430–439.
- Viswanathan, K., Vadivoo, V.S., Raj, G.D., 2014. Rapid determination of hydrogen peroxide produced by *Lactobacillus* using enzyme coupled rhodamine isocyanide/calcium phosphate nanoparticles. Biosens. Bioelectron. 61, 200–208.
- Vogel, J., Luisi, B.F., 2011. Hfq and its constellation of RNA. Nat. Rev. Microbiol. 9, 578–589.
- Völker, U., Andersen, K.K., Antelmann, H., Devine, K.M., Hecker, M., 1998. One of Two OsmC Homologs in *Bacillus subtilis* Is Part of the σ^B -Dependent General Stress Regulon. J. Bacteriol. 180, 4212–4218.
- Wegmann, U., O'Connell-Motherway, M., Zomer, A., Buist, G., Shearman, C., Canchaya, C., Ventura, M., Goesmann, A., Gasson, M.J., Kuipers, O.P., van Sinderen, D., Kok, J., 2007. Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. cremoris MG1363. J. Bacteriol. 189, 3256–3270.
- Wen, Z.T., Burne, R.A., 2004. LuxS-Mediated Signaling in *Streptococcus mutans* Is Involved in Regulation of Acid and Oxidative Stress Tolerance and Biofilm Formation. J. Bacteriol. 186, 2682–2691.
- Westers, H., Westers, L., Darmon, E., van Dijk, J.M., Quax, W.J., Zanen, G., 2006. The CsrRS two-component regulatory system controls a general secretion stress response in *Bacillus subtilis*. FEBS J. 273, 3816–3827.
- Wiegert, T., Schumann, W., 2001. SsrA-mediated tagging in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 183, 3885–3889.
- Wieneke, A.A., Roberts, D., Gilbert, R.J., 1993. Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969–90. Epidemiol. Infect. 110, 519–531.
- Williams, A.M., Fryer, J.L., Collins, M.D., 1990. *Lactococcus piscium* sp. nov. a new *Lactococcus* species from salmonid fish. FEMS Microbiol. Lett. 68, 109–113.
- Williams, C.H., Arscott, L.D., Müller, S., Lennon, B.W., Ludwig, M.L., Wang, P.-F., Veine, D.M., Becker, K., Schirmer, R.H., 2000. Thioredoxin reductase. Eur. J. Biochem. 267, 6110–6117.
- Wilson, A.C., Wu, C.C., Yates, J.R., Tan, M., 2005. Chlamydial GroEL autoregulates its own expression through direct interactions with the HrcA repressor protein. J. Bacteriol. 187, 7535–7542.
- Winter, J., Linke, K., Jatzek, A., Jakob, U., 2005. Severe Oxidative Stress Causes Inactivation of DnaK and Activation of the Redox-Regulated Chaperone Hsp33. Mol. Cell 17, 381–392.

- Wolf, C., Hochgräfe, F., Kusch, H., Albrecht, D., Hecker, M., Engelmann, S., 2008. Proteomic analysis of antioxidant strategies of *Staphylococcus aureus*: Diverse responses to different oxidants. *Proteomics* 8, 3139–3153.
- Wolin, M.S., Burke-Wolin, T.M., Mohazzab-H, K.M., 1999. Roles for NAD(P)H oxidases and reactive oxygen species in vascular oxygen sensing mechanisms. *Respir. Physiol.* 115, 229–238.
- Wood, Z.A., Poole, L.B., Karplus, P.A., 2003. Peroxiredoxin Evolution and the Regulation of Hydrogen Peroxide Signaling. *Science* 300, 650–653.
- Wyder, A.B., Boss, R., Naskova, J., Kaufmann, T., Steiner, A., Graber, H.U., 2011. Streptococcus spp. and related bacteria: their identification and their pathogenic potential for chronic mastitis - a molecular approach. *Res. Vet. Sci.* 91, 349–357.
- Yarwood, J.M., McCormick, J.K., Schlievert, P.M., 2001. Identification of a novel two-component regulatory system that acts in global regulation of virulence factors of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 183, 1113–1123.
- Yarwood, J.M., Schlievert, P.M., 2003. Quorum sensing in Staphylococcus infections. *J. Clin. Invest.* 112, 1620–1625.
- Yeswanth, S., Nanda Kumar, Y., Venkateswara Prasad, U., Swarupa, V., Koteswara rao, V., Venkata Gurunadha Krishna Sama, P., 2013. Cloning and characterization of l-lactate dehydrogenase gene of *Staphylococcus aureus*. *Anaerobe* 24, 43–48.
- Zagorec, M., Christeans, S., coordinatrices, 2013. Flores protectrices pour la conservation des aliments, Synthèses. Editions Quae.
- Zeilstra-Ryalls, J., Fayet, O., Georgopoulos, C., 1991. The Universally Conserved GroE (Hsp60) Chaperonins. *Annu. Rev. Microbiol.* 45, 301–325.
- Zellmeier, S., Schumann, W., Wiegert, T., 2006. Involvement of Clp protease activity in modulating the *Bacillus subtilis* σ^W stress response. *Mol. Microbiol.* 61, 1569–1582.
- Zhan, C., Fedorov, E.V., Shi, W., Ramagopal, U.A., Thirumuruhan, R., Manjasetty, B.A., Almo, S.C., Fiser, A., Chance, M.R., Fedorov, A.A., 2005. The ybeY protein from *Escherichia coli* is a metalloprotein. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 61, 959–963.
- Zhang, Q., Huang, Y., Wang, H., Xu, W., Liu, L., Yin, Y., Zhang, X., 2012. The role of ClpP in protein expression of *Streptococcus pneumoniae*. *Curr. Microbiol.* 64, 294–299.
- Zhang, T., Xie, J., Zhang, M., Fu, N., Zhang, Y., 2015. Effect of a potential probiotics *Lactococcus garvieae* B301 on the growth performance, immune parameters and caecum microflora of broiler chickens. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*
- Zhang, Y.-W., Tiwari, M.K., Gao, H., Dhiman, S.S., Jeya, M., Lee, J.-K., 2012. Cloning and characterization of a thermostable H₂O-forming NADH oxidase from *Lactobacillus rhamnosus*. *Enzyme Microb. Technol.* 50, 255–262.
- Zhu, X., Zhao, Y., Sun, Y., Gu, Q., 2014. Purification and characterisation of plantaricin ZJ008, a novel bacteriocin against *Staphylococcus* spp. from *Lactobacillus plantarum* ZJ008. *Food Chem.* 165, 216–223.
- Zschöck, M., Kloppert, B., Wolter, W., Hamann, H.P., Lämmle, C., 2005. Pattern of enterotoxin genes *seg*, *seh*, *sei* and *sej* positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 108, 243–249.
- Zschöck, M., Riße, K., Sommerhäuser, J., 2004. Occurrence and clonal relatedness of *sec/tst*-gene positive *Staphylococcus aureus* isolates of quartermilk samples of cows suffering from mastitis. *Lett. Appl. Microbiol.* 38, 493–498.

ANNEXES

ANNEXE 1 (page 191 et 192) : Effet de l'interaction bactérienne, de l'aération, de la présence de H₂O₂ et de la température sur l'expression de gènes et protéines de *S. aureus*, *L. lactis* et *L. garvieae* impliqués dans les mécanismes moléculaires décrits dans l'étude bibliographique.

ANNEXE 2 (page 193) : Préparation des milieux de culture utilisés lors de ce travail de thèse.

ANNEXE 3 (page 194) : Protocole de titrage de la solution-mère de H₂O₂ en vue d'en vérifier la concentration.

ANNEXE 4 (pages 195 et 196) : Protocole de déplétion des ARNr avec le kit Magnetic RiboZero pour bactéries à Gram + (tebu-bio Sas, Le-Perray-en-Yvelines, France).

ANNEXE 5 (page 197) : Protocole de détermination de l'effet de surnageants de co-cultures de *L. garvieae* N201 + *S. aureus* SA15, de cultures pures de *S. aureus* SA15 et de BHI non-inoculé, non-traités ou traité avec des protéases, sur la croissance de *S. aureus* SA15 en microplaques.

ANNEXE 6 (pages 198 et 199) : Liste des gènes présents dans le génome d'une souche de *S. aureus* (SA15 ou MW2) et absente de l'autre.

ANNEXE 7 (pages 200 à 212) : Supplementary table 3 de l'article n°3.

ANNEXE 1 : Effet de l'interaction bactérienne, de l'aération, de la présence de H₂O₂ et de la température sur l'expression de gènes et protéines de *S. aureus*, *L. lactis* et *L. garvieae* impliqués dans les mécanismes moléculaires décrits dans l'étude bibliographique.

Le tableau récapitulatif est consultable sur la page suivante. Les effets positifs ou négatifs sont indiqués par des signes « + » ou « - ». Les signes « - / + » un effet variable selon un autre paramètre (généralement le temps) ou des données contradictoires dans la même expérience.

A = étude *in vitro* à 30°C et pH 6,6 de l'effet de *L. lactis* sur le transcriptome de *S. aureus* (Even et al., 2009) ou de *S. aureus* sur le transcriptome de *L. lactis* (Nouaille et al., 2009),

B = étude en modèle fromage de l'effet de *L. lactis* sur le transcriptome de *S. aureus* (Cretenet et al., 2011),

C = étude *in vitro* de l'effet de l'aération (cultures agitées / statiques) sur le transcriptome et protéome de *L. lactis* (Pedersen et al., 2008),

D = étude *in vitro* du passage en anaérobiose (agitée à statique) sur le transcriptome et protéome de *S. aureus* (Fuchs et al., 2007),

E = Base de donnée SAMMD référençant les effets de divers stress sur le transcriptome de *S. aureus* (Nagarajan and Elsas, 2007),

F = étude *in vitro* de l'effet d'une injection de H₂O₂ (5 mM) sur le transcriptome de cellules de *S. aureus* provenant de cultures agitées en milieu de phase exponentielle (Palazzolo-Ballance et al., 2008),

G = étude *in vitro* du transcriptome de *S. aureus* 20 min après injection de H₂O₂ à 10 mM (Chang et al., 2006),

H = étude *in vitro* du transcriptome de *S. aureus* après une injection progressive durant 10 min de H₂O₂ à 10 mM (Deng et al., 2014),

I = Effet d'une exposition de 10 mM de H₂O₂ sur le transcriptome de *S. aureus*, base de donnée Aureolib (Fuchs et al., 2013),

Les deux derniers contextes concernent l'étude *in vitro* de l'effet de la température (37°C / 18°C) sur le transcriptome de deux souches de *L. garvieae* (Aguado-Urda et al., 2013): J = la souche 8831 provenant d'une lactococcose de truite ; K = la souche 21881 provenant d'une endocardite humaine.

	Effet de l'interaction bactérienne			Effet de l'aération			Effet du H ₂ O ₂ sur <i>S. aureus</i>					Effet thermique sur <i>L. garvieae</i>	
	sur <i>S. aureus</i>		sur <i>L. lactis</i>	sur <i>S. aureus</i>		sur <i>L. lactis</i>							
Con- texte	A	B	A	D	E	C	F	G	H	I	E	J	K
<i>noxE</i>						+++							-
<i>noxA</i>						+++							
<i>noxB</i>													
<i>ubiE</i>													-
<i>cydA</i>			+			-	+	++	+				
<i>cydB</i>						-		++					
<i>cydC</i>			+			-	+						-
<i>cydD</i>													-
<i>menB</i>			+	+		+							-
<i>menC</i>													-
<i>menD</i>			+			+							-
<i>menE</i>			+			+							-
<i>menF</i>			+			+	- / +						
<i>menH</i>													-
<i>menX</i>			+			+							
<i>poxB</i> /		- / +	-					+					
<i>sodA</i>	--	+		++	+	++	+		+		+		
<i>sodM</i>											+		
<i>lox</i> /												++	
<i>katA</i>	---	--		+	+						+		
<i>ahpC</i>						++	+			+	+		
<i>ahpF</i>	--	-				++	++				+		
<i>trxA</i>		-					+		+		+		
<i>trxB</i>		-	+				+		+		+		--
<i>grx</i>													
<i>gshR</i>						++							
<i>gpx</i> /						++	+				+		-
<i>groES</i>							- / +					-	
<i>groEL</i>				- / +	-		- / +				- / +	-	
<i>dnaK</i>		++		+									
<i>dnaJ</i>		+	-										
<i>grpE</i>			-				-				-		
<i>clpB</i>	-- / +						- / +			- / +	-	-	
<i>clpC</i>	--	++	-	-			- / +		+	--	+		
<i>clpD</i>													
<i>clpE</i>			-									-	
<i>clpL</i>	-	-- / ++		-	-		-				- / +		
<i>clpP</i>				-	-		- / +		+	+	+		
<i>clpQ</i>	-	-											
<i>clpX</i>		-											
<i>clpY</i>	-												
<i>hfq</i>													
<i>ybeY</i>													
<i>recA</i>		-					+	+	++	++	+		
<i>lexA</i>	---						++	+	+		+		
<i>ohrR</i>													
<i>ohrA</i>													
<i>osmC</i>						+++	- / +	+					
<i>hrcA</i>							-				-		
<i>sigB</i>							-				-		
<i>ctsR</i>	---	++	-				- / +		+		- / +		
<i>cssR</i>													
<i>cssS</i>													
<i>perR</i>		-					+				+		
<i>fur</i>			+				+				+		
<i>codY</i>	-	+											-

ANNEXE 2 : Préparation des milieux de culture utilisés lors de ce travail de thèse.

Bouillon BHI (Brain-Heart Infusion)

Le bouillon BHI a été préparé à partir de 3,7% de BHI en poudre (Brain-Heart Infusion, Biokar Diagnostic, Pantin, France) ajouté à de l'eau distillée. Le bouillon BHI tamponné à pH = 7 a été composé d'un bouillon BHI auquel a été ajouté, pour 100 mL :

- 1,44 g de $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Riedel-deHaen, Honeywell GmbH, Seelze, Germany)
- 0,49 g de K_2HPO_4 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)

Avant utilisation, ces milieux ont été autoclavés à 121°C durant 15 min.

Bouillon M17

Le bouillon M17 a été préparé à partir de 4,22% de M17 en poudre ajouté à de l'eau distillée (Biokar). Avant utilisation, ce milieu a été autoclavé à 115°C durant 20 min.

Bouillon M17

Le lait microfiltré provenait de la laiterie Marguerite (Candia, Lyon, France).

Milieu solide BHI pour étalements

Le milieu solide BHI destiné aux étalements en boîte de Pétri a été composé de la même façon qu'un bouillon BHI non-tamponné auquel a été ajouté 1,5% d'agar bactériologique de type A (Biokar). Avant utilisation, ce milieu a été autoclavé à 121°C durant 20 min.

Milieu solide BP (Baird-Parker) pour étalements

Le milieu solide BP destiné aux étalements en boîte de Pétri a été préparé à partir de 5,8% de poudre BP (Biokar) ajouté à de l'eau distillée. Ce milieu a ensuite été autoclavé à 115°C durant 20 min et laissé refroidir à 48°C. Du plasma de lapin fibrinogène, préparé à partir de lyophilisats en flacons (Biokar) repris dans 10 mL d'eau distillée stérile préchauffée à 37°C, a ensuite été ajouté à hauteur de 10%.

ANNEXE 3 : Protocole de titrage de la solution-mère de H₂O₂ en vue d'en vérifier la concentration.

- Etape n°1 : Titrage du KMnO₄ par l'acide oxalique

Principe : L'ion permanganate MnO₄⁻ (violet) est réduit en Mn²⁺ (quasiment incolore) si l'on se trouve en milieu acide. On utilise donc du H₂SO₄ pour acidifier le milieu. La fin du titrage est indiquée par l'apparition d'une coloration rosée due à un excès de MnO₄⁻.



$$[\text{MnO}_4^-] = ([\text{acide oxalique}] \times \text{Volume d'acide oxalique} \times 2) / \text{Volume titré} \times 5$$

Attention : La réaction peut être plus ou moins rapide. Bien attendre que la coloration ne disparaisse pas avant quelques minutes pour acter la fin du titrage.

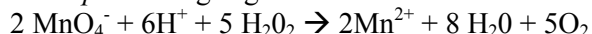
Mode opératoire :

- dans la burette : solution de KMnO₄ à ~ 0,002 M à titrer
- dans le bécher : 10 mL d'acide oxalique à 0,005 M
15 mL environ d'H₂SO₄ à 2 M
50 mL d'eau distillée chaude

Placer le bécher sur un agitateur pour garder un mélange homogène en permanence.
Théoriquement, le titrage s'arrête aux alentours de 10 mL.

- Etape n°2 : Titrage de la solution mère de peroxyde d'hydrogène :

Principe : Dosage également basé sur la réduction de l'ion permanganate en milieu acide.



$$[\text{H}_2\text{O}_2] = ([\text{MnO}_4^-] \times \text{Volume titré} \times 5) / \text{Volume de H}_2\text{O}_2 \times 2$$

Attention : La réaction peut être plus ou moins rapide. Bien attendre que la coloration ne disparaisse pas avant quelques minutes pour acter la fin du titrage.

Mode opératoire :

- dans la burette : solution de KMnO₄ précédemment dosée
- dans le bécher : 10 mL de la solution mère de H₂O₂ à doser
diluée au 1/2000^e dans de l'eau stérile
15 mL environ d'H₂SO₄ à 2M
10 mL d'eau distillée chaude

Placer le bécher sur un agitateur pour garder un mélange homogène en permanence.
Théoriquement, le titrage s'arrête aux alentours de 10 mL.

- Validité du dosage :

La concentration de la solution mère doit être comprise entre 29% et 31%/

d = 1,11, soit 1L → 1110 g donc 1110 x 29% = 321,9g et 1110 x 31% = 344,1g.

La masse molaire du peroxyde d'hydrogène est de 34 g/mol, donc :

$$- [\text{H}_2\text{O}_2]_{\min} = 321,9/34 = 9,47 \text{ M}$$

$$- [\text{H}_2\text{O}_2]_{\max} = 344,1/34 = 10,12 \text{ M}$$

ANNEXE 4 : Protocole de déplétion des ARNr avec le kit Magnetic RiboZero pour bactéries à Gram + (tebu-bio Sas, Le-Perray-en-Yvelines, France).

Le Kit Magnetic Ribo-Zero for Gram-Positive Bacteria (6rx) contient deux boîtes :

➤ <u>RiboZero rRNA Removal Reagents (stockage entre -70 et -80°C)</u>	
- Ribo Guard RNase Inhibitor 100 U/μL	10 μL
- rRNA Removal Solution – (G – PB)	75 μL
- RiboZero Reaction Buffer	50 μL
- Glycogen	20 μL
- Sodium Acetate	150 μL
- RNase-Free Water	2 x 1 mL

➤ <u>Magnetic Core Kit (stockage à 4°C, NE PAS CONGELER !)</u>	
- Magnetic Beads	1,4 mL
- Magnetic Bead Resuspension Solution	500 μL
- RNase-Free Water	3 mL

NB : Le kit pour 24 réactions a également été utilisé.

Avant-propos : Le protocole comporte 4 étapes. Les étapes 1 à 3 doivent se faire successivement. L'étape 4 peut s'effectuer plus tard, si congélation des échantillons à la fin de l'étape 3.

1. Etape n°1 : Préparation des billes magnétiques

- Sortir les Removal Reagents du congélateur et les placer dans la glace. Placer le Magnetic Core Kit à RT quelques minutes pour équilibrer la température.
- Mélanger les Magnetic Beads par pipettage.
- Pipetter 225 μL x nombre de réactions à effectuer dans un tube 1,5 mL RNase-free
- Placer le tube sur un support magnétique durant au moins 1 minute, la solution doit devenir claire.
- Enlever le surnageant par pipettage en laissant le tube sur le support magnétique (sous hotte : présence de sodium azide).
- Enlever le tube du support magnétique et ajouter le même volume qu'enlevé (225 μL x nombre de réactions à effectuer) d'eau RNase-free.
- Mélanger doucement et brièvement, répéter les 3 derniers points de façon à effectuer un deuxième lavage à l'eau.
- Placer le tube sur support magnétique au moins une minute, puis prélever et jeter le surnageant à la pipette.
- Enlever le tube du support magnétique, ajouter 60 μL x nombre de réactions à effectuer de Magnetic Beads Resuspension Reagent, mélanger par pipettage puis vortexer doucement.
- Aliquoter 65 μL x nombre de réactions à effectuer dans le nombre de tubes 1,5 mL RNase-free souhaité.
- Optionnel : Ajouter 1 μL de RiboGuard RNase Inhibitor, vortexer brièvement.
- Stocker les aliquots de billes à RT jusqu'à leur utilisation à l'étape n°3.

2. Etape n°2 : Destruction des ARNr

- Les volumes à traiter dépendent de la quantité en ARN de chaque échantillon !
 - volume d'ARN en réaction : 28 μL (si < 2,5 μg), 26 μL (si > 2,5 μg)
 - volume de RiboZero Removal Solution : 8 μL (si < 2,5 μg), 10 μL (si > 2,5 μg)
- Dans un tube à PCR 0,2 mL, ajouter :
 - 4 μL RiboZero Reaction Buffer
 - 26 ou 28 μL d'ARN à traiter
 - 8 ou 10 μL de RiboZero Removal Solution (cf. premier point)

- Mélanger doucement
- Ranger les réactions RiboZero Removal Reagents à -70°C
- Mettre le tube dans un thermocycler avec comme réaction : - 68°C 10 min
- 22°C 5 min
- Laisser à RT et passer immédiatement à l'étape n°3.

3. **Etape n°3 : Déplétion et évacuation des ARNr**

- Régler le bain-marie à 50°C
- Ajouter le volume d'ARN traité de l'étape n°2 à un aliquot de billes préparé à l'étape n°1, et mélanger immédiatement à la pipette au moins 10 fois. Puis vortexer le tube immédiatement à moitié régime durant 10 secondes. Laisser à RT.
- Incuber 5 min à RT.
- Vortexer doucement 10 s.
- Incuber au bain-marie 5 min à 50°C.
- Placer immédiatement le tube sur un support magnétiquement durant au moins 1 minute (jusqu'à éclaircissement).
- Enlever doucement le surnageant (ARN déplété en ARNr) et le transférer dans un tube 1,5 mL RNase-free. Vérifier sur le support magnétique qu'il ne reste pas de billes, s'il en reste, enlever le surnageant et placer dans un nouveau tube.
- Placer le tube sur de la glace si l'étape 4 est effectuée dans la foulée, sinon stocker à -80°C.

4. **Etape n°4 : Purification à l'éthanol**

- Pooler les réplicats de déplétion d'un même échantillon.
- Ajuster le volume de chaque échantillon à 180 µL en utilisant de l'eau RNase-free.
- Ajouter 18 µL d'Acetate de Sodium 3M (0,1 volume).
- Ajouter 2 µL de Glycogène (10mg/mL).
- Vortexer doucement.
- Ajouter 600 µL d'éthanol 100% froid (3 volumes)
- Vortexer doucement.
- Incuber à -20°C entre 1 h (minimum) et une journée.
- Centrifuger à 12000 x g 30 min.
- Enlever délicatement et jeter le surnageant.
- Reprendre le culot dans 600 µL d'éthanol 70%, centrifuger 12000 x g 5 min.
- Répéter les deux points précédents une fois (lavage à l'éthanol 70%).
- Enlever délicatement et jeter le surnageant. Effectuer une short-centrifugation pour faire tomber l'éthanol restant : enlever et jeter délicatement (cônes 10-100 µL).
- Incuber les tubes ouverts (séchage) durant 5min à RT (sous hotte).
- Reprendre le culot dans 11,5 µL d'eau RNase-free, stocker à -80°C.

J+0 = prélèvement des surnageants :



ANNEXE 6 : Liste des gènes présents dans le génome d'une souche de *S. aureus* (SA15 ou MW2) et absente de l'autre.

Les indications de chaque liste correspondent aux annotations des CDS du génome d'une des souches lorsque ces CDS ne s'alignent pas sur le génome de l'autre souche avec l'algorithme BWA-MEM. Lorsque plusieurs CDS sont annotées de manière identique, le nombre est indiqué entre parenthèses.

présents chez SA15 et absents chez MW2 (133)	présents chez MW2 et absents chez SA15 (160)
5-aminolevulinate synthase	ABC transporter ATP-binding protein
ABC-type transporter ATP-binding protein EcsA	ABC transporter permease (2)
ABI-like protein	ABI-like protein (2)
antirepressor	accumulation-associated protein
Arsenate-mycothiol transferase ArsC2	acetyltransferase (2)
ATP-dependent DNA helicase PcrA	acyldehydratase
ATP-dependent RecD-like DNA helicase	ATP-dependent DNA helicase
Bacteriophage replication gene A protein (GPA)	beta-lactamase
Bacteriophage scaffolding protein D	cassette chromosome recombinase a
CAAX amino terminal protease self- immunity (2)	cassette chromosome recombinase b
Divergent AAA domain protein	cell wall surface anchor protein
DNA helicase	cobalt ABC transporter ATP-binding protein
DNA-binding partial	cobalt transporter
DNA-binding protein (2)	Collagen adhesin
EamA-like transporter family protein	Complement inhibitor scin
ERF superfamily protein	Cytosolic protein
excisionase	d-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase
Family transcriptional regulator	DNA-binding protein
Had family hydrolase	Ear protein
helix-turn-helix DNA binding protein	endodeoxyribonuclease
HTH-type transcriptional activator HxIR	Endopeptidase resistance protein
hypothetical phage-related protein (3)	enterotoxin
Hypothetical protein (15)	enterotoxin a sea
Inner membrane transport permease YbhR	enterotoxin H
Inner membrane transport protein YdhC	enterotoxin sek
Integrase core domain protein	enterotoxin seq
lipoprotein	Family transcriptional regulator (3)
major antigen-like	Genomic island nu sa alpha2 (3)
Major spike protein (G protein)	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase
membrane protein (7)	Gnat family acetyltransferase
membrane spanning protein	HMG-CoA synthase
Metallothiol transferase FosB	Hnh endonuclease
Microvirus H protein (pilot protein)	hth-type transcriptional regulator sart
Microvirus J protein	hth-type transcriptional regulator saru
Murein DD-endopeptidase MepM	hypothetical phage protein
Nitricoxide reductase subunit B	Hypothetical protein (17)
Nitronate monooxygenase	Integrase (4)
Pathogenicity island protein (4)	Iron complex transport system substrate-binding protein
pf07252 family protein	lipoprotein
pf12358 family protein	major facilitator superfamily transporter
phage DNA-binding protein	membrane protein (12)
phage likeprotein	metallo-beta-lactamase
phage minor head protein	Methicillin resistance mec1 protein
phage protein (18)	Mfs transporter
Phage protein C	nadh:ubiquinone oxidoreductase
phage pvl protein	orf 56
phage repressor protein	oxidoreductase
phage transcriptional regulator	Pathogenicity island family protein
phage transcriptional repressor	penicillin binding protein 2 methicillin resistance determinant

phage-derived single-stranded DNA-binding protein (2)	peptide ABC transporter ATP-binding protein
phagic LexA-like repressor	pf03235 family protein
Phagic PemK-like protein	pf06114 domain protein
phi eta orf 25-like protein	pf07799 family protein
phi pv83 orf 10-like protein	pf12102 domain protein (2)
phi pv83 orf 19-like protein	phage DNA family a
Protease synthase and sporulation protein PAI 2	phage protein (19)
Proteins of 100 residues with WXG	Primosome subunit
putative ABC transporter ATP-binding protein YbhF	recombinase
Putative ATP-dependent DNA helicase YjcD	Recombination protein
putative NAD-dependent malic enzyme 2	replication initiation protein (2)
Replication initiation and membrane attachment	repressor
Replication protein	rhodanese
Replicative DNA helicase	Rnd transporter
Restriction enzyme BglI subunit alpha	s-adenosyl-L-methionine hydroxide
Restriction enzyme BglI subunit beta	adenosyltransferase
Sap domain-containing protein	single-strand DNA-binding protein
seps16b protein	<i>Staphylococcus aureus</i> paralogous family
Siphovirus Gp157	staphylokinase
Staphylococcal complement inhibitor precursor	tandem five-tm protein (3)
topoisomerase	tandem lipoprotein
Toxic shock syndrome toxin-1	Tetracenomycin polyketide synthesis o-
Transcriptional regulator family	methyltransferase
Transcriptional repressor AdcR	Transcriptional regulator (3)
transposase (3)	transposase (7)
Transposase from transposon Tn916	Trp repressor binding protein
Tyrosine recombinase XerC	type I site-specific deoxyribonuclease restriction
Tyrosine recombinase XerD	subunit
	Uncharacterized conserved protein
	upf0397 protein hmpref0776_0754
	Xre family transcriptional regulator (2)

ANNEXE 7 : Supplementary table 3 de l'article n°3.

Supplementary table 3. Genes differentially expressed depending on the changing aeration level according to the three R packages used (DESeq, DESeq2 and EdgeR). Only significant ratios of the expression of genes under the high aeration level / under the low aeration level are indicated either in pure culture or in co-culture.

- (A) Genes differentially expressed and discussed in this article.
- (B) Other genes differentially expressed both in pure culture and in co-culture.
- (C) Other genes differentially expressed exclusively in pure culture.
- (D) Other genes differentially expressed exclusively in co-culture.

(A) Genes differentially expressed and discussed in this article.

Name	Description	ratio of gene expression in pure culture under the high / low aeration level			ratio of gene expression in co-culture under the high / low aeration level		
		DESeq	DESeq2	EdgeR	DESeq	DESeq2	EdgeR
O₂ metabolism							
	Electron Transport Chain						
<i>cydB</i>	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit II		1.96	2.72	2.35	2.27	2.78
<i>menH</i>	2-succinyl-6-hydroxy-2,4-cyclohexadiene-1-carboxylate synthase		2.67			2.64	
<i>ubiE</i>	Ubiquinone/menaquinone biosynthesis methyltransferase UBIE	0.13	0.15	0.18	0.17	0.18	0.20
<i>cydA</i>	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit I			2.14			
<i>cydC</i>	Transport ATP-binding protein CydC			2.19			
<i>menC</i>	O-succinylbenzoate-CoA synthase		2.56				
<i>menB</i>	Naphthoate synthase		2.23	2.87			
<i>menD</i>	2-succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexene-1-carboxylic-acid synthase		2.73	3.50			
LCGN_0364	Putative coproporphyrinogen III oxidase of BS HemN-type oxygen-independent in heat shock gene cluster		1.99				
	Other						
<i>lox</i>	Lactate 2-monooxygenase		0.26			0.46	
<i>noxE</i>	NADH oxidase		0.30	0.34			
LCGN_0208	Lactate 2-monooxygenase		0.31				

Peroxide / H₂O₂ metabolism						
Synthesis of H₂O₂						
<i>pox</i>	Pyruvate oxidase	0.40		0.50		
<i>spxA1</i>	Transcriptional regulator SpxA1	0.14	0.14	0.20	0.22	
Resistance to H₂O₂						
<i>trxA2</i>	Thioredoxin	2.22	2.90	2.50	2.43	2.91
<i>ahpF</i>	Alkyl hydroperoxide reductase protein F	0.35	0.44		0.42	
<i>ahpC</i>	Alkyl hydroperoxide reductase protein C				0.53	
Resistance to other peroxides						
<i>ohrA</i>	Organic hydroperoxide resistance protein	33.80	24.43	48.30	45.26	39.96
<i>ohrR</i>	Organic hydroperoxide resistance transcriptional regulator		3.25			55.21
						4.64
Nutritional metabolisms						
Threonine metabolism						
LCGN_1919	L-threonine 3-dehydrogenase	2.54	3.19	2.48	2.41	2.90
LCGN_1920	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase	2.82	3.62	2.65	2.59	3.10
<i>ilvA</i>	Threonine dehydratase, catabolic	0.22	0.26		0.25	0.30
LCGN_1922	Alanine dehydrogenase	0.28	0.35		0.38	
Threonine and lysine metabolism						
LCGN_0576	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	3.05				
LCGN_0577	Aspartokinase	3.20				
Lysine metabolism						
LCGN_0575	2345-tetrahydropyridine-26-dicarboxylate N-acetyltransferase	3.06				
LCGN_0578	N-acetyl-LL-diaminopimelate deacetylase	2.54				
Galactose metabolism						
LCGN_1809	UDP-glucose 4-epimerase				2.89	3.38
LCGN_1810	Galactose-1-phosphate uridylyltransferase				4.06	5.33
LCGN_1811	Galactokinase				4.43	5.92
LCGN_1812	Aldose 1-epimerase			6.05	4.87	6.34
Transport and extracellular compounds						
Bacteriocin						
LCGN_0476	putative garvieaecin Q	0.34			0.41	
Vitamins and vitamers						
LCGN_0251	Substrate-specific component RibU of riboflavin ECF transporter	0.13	0.13		0.12	0.11
LCGN_0714	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase	2.91		3.36	3.26	3.70
LCGN_1870	Substrate-specific component FoIT of folate ECF transporter	4.97	4.16	5.62	3.59	3.27
Monosaccharide						
LCGN_0332	Unspecified monosaccharide ABC transport	2.01				

	system permease component 2						
	Metals						
<i>znuA</i>	Zinc ABC transporter, periplasmic-binding protein ZnuA		0.25			0.35	
LCGN_0683	Lead, cadmium, zinc and mercury transporting ATPase %3B Copper-translocating P-type ATPase	0.15	0.17	0.20	0.19	0.20	0.22
LCGN_1104	Lead, cadmium, zinc and mercury transporting ATPase %3B Copper-translocating P-type ATPase			2.82		2.12	2.59
LCGN_0139	Lead cadmium zinc a mercury transporting ATPase %3B Copper-translocating P-type ATPase		0.32				
LCGN_1428	Lead cadmium zinc a mercury transporting ATPase %3B Copper-translocating P-type ATPase		0.31				
LCGN_1867	Cobalt-zinc-cadmium resistance protein		2.12				
LCGN_1426	Negative transcriptional regulator-copper transport operon		0.39				
LCGN_1427	Copper chaperone		0.20	0.23			
<i>feoA</i>	Ferrous iron transport protein A		0.33				
<i>feoB</i>	Ferrous iron transport protein B					0.32	
Stress response							
<i>hrcA</i>	Heat-inducible transcription repressor HrcA	0.06	0.08	0.08	0.19	0.22	0.22
<i>groES</i>	Heat shock protein 60 family co-chaperone GroES		0.35	0.44		0.47	
<i>groEL</i>	Heat shock protein 60 family chaperone GroEL		0.23	0.27	0.31	0.33	0.38
<i>dnaK</i>	Chaperone protein DnaK	0.04	0.07	0.06	0.07	0.08	0.09
<i>dnaJ</i>	Chaperone protein DnaJ	0.11	0.15	0.16	0.23	0.24	0.27
<i>grpE</i>	Heat shock protein GrpE	0.04	0.05	0.05	0.12	0.13	0.14
<i>clpB</i>	ClpB protein	0.12	0.14	0.17	0.23	0.24	0.27
LCGN_1088	Universal stress protein family		0.31	0.37		0.40	
LCGN_1532	Universal stress protein family		0.26	0.32	0.32	0.34	0.38
LCGN_1556	Universal stress protein family	0.13	0.15	0.18		0.21	0.23
LCGN_1557	Universal stress protein family		0.45			0.47	
<i>uspA</i>	Universal stress protein UspA		0.40			0.45	

(B) Other genes differentially expressed both in pure culture and in co-culture.

	Name	Description	ratio of gene expression in pure culture under the high / low aeration level			ratio of gene expression in co-culture under the high / low aeration level		
			DESeq	DESeq2	EdgeR	DESeq	DESeq2	EdgeR
203	LCGN_0004	Predicted sugar phosphatase of HAD family		0.30	0.37		0.30	0.34
	LCGN_0006	LSU ribosomal protein L9p		0.40			0.40	
	LCGN_0059	hypothetical protein	0.18	0.20	0.23	0.29	0.30	0.34
	LCGN_090	COG3525: N-acetyl-beta-hexosaminidase		0.34			0.32	
	LCGN_0116	rRNA methylase		0.38			0.48	
	LCGN_0117	Acylphosphate phosphohydrolase , putative		0.52			0.50	
		PTS system, N-acetylglucosamine-specific						
		IIA component / PTS system, N-						
	<i>ptbA</i>	acetylglucosamine-specific IIB component /		1.97			2.29	
		PTS system, N-acetylglucosamine-specific						
		IIC component						
	LCGN_0140	Transcriptional regulator, PadR family		3.61			4.32	5.44
	LCGN_0141	similar to membrane protein		3.24			3.86	4.78
	LCGN_0142	hypothetical protein		3.15	4.21	4.58	4.24	4.92
	<i>bacA / uppP</i>	Undecaprenyl-diphosphatase		3.29	4.26	3.57	3.42	3.89
	LCGN_0144	Transcriptional regulator, TetR family		2.67	4.48	3.13		3.98
	LCGN_0145	hypothetical protein	4.76	3.87	7.13	4.85	4.19	6.08
		Putative Dihydrolipoamide dehydrogenase						
	LCGN_0146	%3B Mercuric ion reductase %3B PF00070	7.38	5.84	10.86	9.94	8.56	12.04
		family, FAD-dependent NAD(P)-disulphide						
		oxidoreductase						
	<i>cbiB / metC</i>	Cystathionine gamma-lyase	8.51	7.11	11.92	9.48	8.49	11.51
	LCGN_0148	hypothetical protein		0.49			0.45	
	LCGN_0149	hypothetical protein		0.43		0.37	0.39	
	LCGN_0153	FMN-dependent NADH-azoreductase	0.22	0.24			0.30	
	LCGN_0154	Ribosomal subunit interface protein		0.28		0.34	0.35	
		Glycine betaine ABC transport system,						
	LCGN_0158	permease protein OpuAB / Glycine betaine		0.40		0.36	0.38	
		ABC transport system, glycine betaine-						
		binding protein OpuAC						
	LCGN_0199	Ribose ABC transport system, high affinity		3.15			2.93	
		permease RbsD						
	LCGN_0200	Ribokinase		3.67		3.44	3.17	
	<i>rbsR</i>	Ribose operon repressor		3.51		3.58	3.29	
	LCGN_0203	hypothetical protein		0.42			0.51	
	LCGN_0204	hypothetical protein		0.40			0.50	
	LCGN_0233	multidrug resistance protein		0.43			0.51	
	LCGN_0244	hypothetical protein		0.27	0.33	0.32	0.34	0.38

LCGN_0276	Dihydroorotase	0.13	0.16	0.15		0.21	0.20
LCGN_0277	Orotate phosphoribosyltransferase		0.16	0.15	0.25	0.27	
LCGN_0287	hypothetical protein		0.30	0.34		0.40	
<i>vraS</i>	Sensor histidine kinase VraS		0.40			0.47	
<i>vraR</i>	Two component transcriptional regulator VraR		0.46			0.52	
LCGN_0295	hypothetical protein		0.29	0.36	0.32	0.34	0.38
LCGN_0300	Carbamoyl-phosphate synthase large chain		0.25	0.22		0.21	0.18
<i>pydB</i>	Dihydroorotate dehydrogenase electron transfer subunit B		0.17	0.10		0.17	0.12
<i>elaA</i>	ElaA protein		2.15			1.89	
<i>parC</i>	Topoisomerase IV subunit A		2.55	3.32		2.21	2.43
LCGN_0365	Phage lysin, glycosyl hydrolase, family 25		2.66			2.17	
LCGN_0368	Transporter		4.40	6.13	4.48	4.11	4.69
LCGN_0398	putative amino acid permease	0.03	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04
LCGN_0402	hypothetical protein		0.31	0.38		0.31	0.35
LCGN_0411	transcription regulator		0.27	0.32		0.27	0.31
LCGN_0412	hypothetical protein		0.32			0.31	
LCGN_0420	Transcriptional regulator, TetR family		0.38			0.21	
LCGN_0454	Glycerol kinase	0.06	0.07	0.07	0.04	0.04	0.05
LCGN_0455	Aerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	0.10	0.11	0.12	0.07	0.08	0.08
<i>glpF</i>	Glycerol uptake facilitator protein		0.28	0.29		0.18	0.17
LCGN_0483	putative acetyltransferase		2.23	3.01		1.81	2.20
LCGN_0494	hypothetical protein		0.42			0.46	
LCGN_0513	PTS system N-acetylgalactosamine-specific IIA component	0.06	0.09	0.08	0.09		0.10
<i>ptnD</i>	PTS system, mannose-specific IID component	0.10	0.14	0.13	0.10		0.12
LCGN_0522	Galactosamine-6-phosphate isomerase	0.22	0.24		0.22	0.23	
LCGN_0523	Tagatose-6-phosphate kinase	0.22	0.24		0.25	0.26	
<i>lacD / lacF</i>	Tagatose 1,6-diphosphate aldolase		0.25		0.25	0.26	
LCGN_0555	UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase		0.45			0.50	
LCGN_0564	conserved hypothetical protein	6.27	4.50	6.67	6.93	5.98	7.49
LCGN_0565	Transcriptional regulator, MarR family	7.53	5.35	8.12	8.05	6.65	8.53
LCGN_0566	CAAX amino terminal protease family	8.23	5.47	9.10		5.55	7.70
LCGN_0567	putative tryptophan transport protein	10.36	6.20	10.93	10.74	7.49	11.05
LCGN_0610	hypothetical protein	34.11	25.29	48.32	42.40	36.50	52.69
LCGN_0625	Alpha-acetolactate decarboxylase		2.34	3.08	3.00	2.91	3.46
LCGN_0638	hypothetical protein		0.20		0.21	0.22	0.23
LCGN_0660	Dihydrolipoamide dehydrogenase of acetoin dehydrogenase		2.79	3.88	2.57	2.46	3.14
LCGN_0661	Dihydrolipoamide acetyltransferase			2.95		2.05	2.63

	component (E2) of acetoin dehydrogenase complex						
LCGN_0699	Ribonuclease P protein component		2.50			2.39	
<i>gatA</i>	Aspartyl-tRNA(Asn) amidotransferase subunit A @ Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A		1.92	2.55		1.95	2.24
<i>gatB</i>	Aspartyl-tRNA(Asn) amidotransferase subunit B @ Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit B		2.18	2.84		2.22	2.55
<i>glpG</i>	GlpG protein (membrane protein of glp regulon)		3.11			3.19	3.07
<i>arcA</i>	Arginine deiminase	11.61	9.59	13.51	9.75	9.44	11.03
<i>arcB</i>	Ornithine carbamoyltransferase	9.48	8.08	11.16	8.09	7.75	9.14
<i>arcD</i>	Arginine/ornithine antiporter ArcD	7.68	6.99	9.64	6.76	6.42	7.38
<i>arcC</i>	Carbamate kinase	7.98	7.14	9.84	6.19	5.92	6.95
LCGN_0724	COG3760, similarity to aminoacyl-tRNA editing enzymes YbaK, ProX	11.45	7.93	12.39	6.61	5.71	7.62
<i>aspB</i>	Aspartate aminotransferase	9.94	6.89	10.59	6.49	5.57	7.34
LCGN_0775	Predicted L-lactate dehydrogenase, hypothetical protein subunit YkgG	0.07	0.09	0.09	0.09	0.09	0.10
LCGN_0776	Predicted L-lactate dehydrogenase, Iron-sulfur cluster-binding subunit YkgF		0.23	0.21		0.22	0.21
LCGN_0777	Predicted L-lactate dehydrogenase, Fe-S oxidoreductase subunit YkgE		0.20	0.19		0.21	0.21
LCGN_0824	Cysteine ABC transporter, substrate-binding protein			2.10		1.96	2.39
LCGN_0842	morphogenesis protein		0.27			0.10	0.07
<i>nifJ</i>	Pyruvate-flavodoxin oxidoreductase		0.38			0.32	0.32
LCGN_0867	Hypothetical protein ywlG		0.46			0.51	
LCGN_0885	hypothetical protein		0.27			0.28	
LCGN_0903	Ribosomal subunit interface protein	0.23	0.24	0.29		0.27	0.30
LCGN_0913	Pyruvate carboxyl transferase		2.53	3.22	2.57	2.45	2.79
LCGN_0916	hypothetical protein		0.21	0.24		0.31	0.36
LCGN_0932	Tripeptide aminopeptidase			2.43		2.15	2.63
LCGN_0934	hypothetical protein		0.34			0.27	
LCGN_0935	hypothetical protein		0.30		0.22	0.23	0.26
LCGN_0970	Hypothetical, related to broad specificity phosphatases COG0406		0.38			0.47	
<i>spxA2</i>	Transcriptional regulator SpxA2		0.11	0.12		0.12	0.13
LCGN_0992	Shikimate/quinate 5-dehydrogenase I beta		0.32		0.39	0.40	
LCGN_1010	HD family hydrolase		0.18	0.21		0.16	0.17
LCGN_1014	membrane protein		0.31	0.36		0.44	0.51
LCGN_1017	hypothetical protein		0.36			0.50	

<i>alaS</i>	Alanyl-tRNA synthetase		2.71	3.48		2.38	2.70
<i>smpB</i>	tmRNA-binding protein SmpB		0.31			0.37	
<i>serS</i>	Seryl-tRNA synthetase		0.22	0.26		0.21	0.23
<i>malR</i>	Maltose operon transcriptional repressor MalR, LacI family		0.44			0.51	
<i>mutY</i>	A/G-specific adenine glycosylase		2.16			1.80	
<i>LCGN_1215</i>	Transcriptional regulator, TetR family	0.18	0.21	0.23		0.29	0.32
<i>LCGN_1391</i>	COG0779: clustered with transcription termination protein NusA		0.35		0.39	0.40	
<i>nusA</i>	Transcription termination protein NusA		0.35	0.44		0.42	
<i>LCGN_1393</i>	COG2740: Predicted nucleic-acid-binding protein implicated in transcription termination		0.37			0.40	
<i>LCGN_1394</i>	ribosomal protein L7Ae family protein		0.32			0.40	
<i>infB</i>	Translation initiation factor 2		0.27	0.34		0.32	0.37
<i>rbfA</i>	Ribosome-binding factor A	0.18	0.21	0.25		0.28	0.33
<i>celB</i>	PTS system, cellobiose-specific IIC component		2.69			2.38	
<i>LCGN_1432</i>	hypothetical protein		2.87			2.18	
<i>LCGN_1433</i>	Acetylornithine deacetylase/Succinyl- diaminopimelate desuccinylase and related deacylases		2.74			2.34	
<i>LCGN_1444</i>	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating		0.27			0.33	
<i>LCGN_1445</i>	Gluconokinase		0.43		0.36	0.38	
<i>pyrR</i>	Uracil phosphoribosyltransferase / Pyrimidine operon regulatory protein PyrR		0.25			0.31	
<i>pyrP</i>	Uracil permease		0.28			0.28	
<i>LCGN_1451</i>	Carbamoyl-phosphate synthase small chain		0.21	0.14			0.16
<i>LCGN_1453</i>	negative regulator of proteolysis		0.27				0.24
<i>LCGN_1471</i>	Glycerol kinase		0.37		0.38	0.39	
<i>LCGN_1473</i>	Activator of (R)-2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase		0.30		0.17	0.19	0.18
<i>LCGN_1474</i>	Oxidoreductase		0.30		0.16		0.18
<i>LCGN_1481</i>	SSU ribosomal protein S16p		0.43			0.54	
<i>LCGN_1487</i>	Fumarate reductase flavoprotein subunit	0.08	0.09	0.10	0.14	0.16	0.17
<i>LCGN_1504</i>	Arginine/ornithine antiporter ArcD	0.15	0.17	0.19	0.16	0.16	0.18
<i>LCGN_1505</i>	Xaa-His dipeptidase	0.10	0.12	0.13	0.09	0.10	0.11
<i>LCGN_1525</i>	5'-nucleotidase YjjG			2.57		1.97	
<i>LCGN_1530</i>	Glyoxalase family protein		0.18	0.19		0.43	
<i>LCGN_1541</i>	Nucleoside-binding protein		0.34	0.43		0.38	0.43
<i>LCGN_1555</i>	hypothetical protein		0.35			0.46	
<i>scpB</i>	Segregation and condensation protein B		2.77		2.63	2.50	

LCGN_1610	Redox-sensitive transcriptional regulator (AT-rich DNA-binding protein)		0.33		0.39	0.41	
LCGN_1611	Malolactic regulator	5.11	4.55	6.29	4.61	4.40	5.17
LCGN_1625	hypothetical protein		2.47	3.12		2.19	
LCGN_1626	TPR-repeat-containing protein		2.36	2.98		2.17	
LCGN_1656	PTS system, beta-glucoside-specific IIA/B/C component		3.02	5.42			3.80
LCGN_1657	6-phospho-beta-glucosidase		3.95	7.50			4.94
LCGN_1658	6-phospho-beta-glucosidase		4.09	7.36		3.15	5.34
<i>gidA</i>	tRNA uridine 5-carboxymethylaminomethyl modification enzyme GidA	4.93	4.30	5.97	3.14	2.99	
LCGN_1710	cation-transporting ATPase		0.38		0.30	0.32	
LCGN_1736	arginine repressor		0.42			0.48	
LCGN_1737	hypothetical protein		0.31			0.47	
LCGN_1745	Transcriptional regulator, repressor of the glutamine synthetase, MerR family		0.33			0.49	
LCGN_1766	Fibronectin-binding protein		2.00	2.56		2.01	
<i>adhE</i>	Alcohol dehydrogenase %3B Acetaldehyde dehydrogenase		0.21	0.24	0.15	0.17	0.18
LCGN_1773	6-phosphogluconolactonase		0.40			0.48	
LCGN_1795	tRNA dihydrouridine synthase B		2.42			2.32	
<i>cutC</i>	Cytoplasmic copper homeostasis protein cutC		0.35			0.46	
LCGN_1853	hypothetical protein		0.37	0.48		0.52	
LCGN_1890	Orf32		0.35			0.48	
<i>nrdD</i>	Ribonucleotide reductase of class III (anaerobic), large subunit		0.29	0.36	0.35	0.36	0.40
LCGN_1932	LSU m5C1962 methyltransferase RImI		0.42			0.43	

(C) Other genes differentially expressed exclusively in pure culture.

Name	Description	ratio of gene expression in pure culture under the high / low aeration level		
		DESeq	DESeq2	EdgeR
LCGN_0078	hypothetical protein		0.48	
LCGN_0091	Putative stomatin/prohibitin-family membrane protease subunit YbbK		0.32	0.41
LCGN_0097	hypothetical protein		0.42	
LCGN_0105	hypothetical protein		0.46	
LCGN_0163	hypothetical protein		0.29	
LCGN_0170	lmo0472		0.43	
LCGN_0174	hypothetical protein		0.40	
LCGN_0198	Putative ribose uptake protein RbsU GRP transporter family		3.51	
LCGN_0209	Conserved hypothetical protein ArsC related		0.33	
LCGN_0228	Nucleoside diphosphate kinase		0.44	
LCGN_0239	Protein of unknown function DUF1211		0.29	
LCGN_0240	hypothetical protein		0.35	
LCGN_0241	Glyoxalase family protein		0.36	
LCGN_0324	hypothetical protein		0.35	
LCGN_0347	DNA polymerase III epsilon chain		2.05	
LCGN_0363	hypothetical protein		2.41	
LCGN_0396	Predicted esterase	0.15	0.22	
LCGN_0397	Glyoxalase family protein		0.14	0.13
LCGN_0406	General stress protein Gls24 family		0.34	0.43
LCGN_0427	hypothetical protein		0.53	
LCGN_0482	Enolase			2.10
LCGN_0484	LSU ribosomal protein L20p		0.47	
LCGN_0491	hypothetical protein		0.33	
LCGN_0503	hypothetical protein		0.33	
LCGN_0506	PlcB ORFX ORFP ORFB ORFA Idh gene		0.35	0.43
LCGN_0516	PTS system mannose-specific IIC component		0.17	0.15
LCGN_0589	hypothetical protein	4.51	3.72	6.06
LCGN_0598	Lipoprotein signal peptidase		1.96	
mtlD	Mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase		3.64	
mtlF	PTS system mannitol-specific IIA component		3.00	
LCGN_0608	Mannitol operon activator BglG family		3.66	
mtlA	PTS system mannitol-specific IIB component / PTS system mannitol-specific IIC component		3.45	
LCGN_0662	Acetoin dehydrogenase E1 component beta-subunit			2.15
LCGN_0671	Hydrolase (HAD superfamily)		2.17	
LCGN_0677	phage infection protein		1.96	
LCGN_0689	GTP pyrophosphokinase (p)ppGpp synthetase I			2.29

<i>codY</i>	GTP-sensing transcriptional pleiotropic repressor <i>codY</i>	0.34	0.42
<i>hepB / ispB</i>	Heptaprenyl diphosphate synthase component II	0.36	
<i>LCGN_0773</i>	acetyltransferase GNAT family	0.40	
<i>LCGN_0813</i>	hypothetical protein	2.08	
<i>fni / idi / yebB</i>	Isopentenyl-diphosphate delta-isomerase FMN-depe ent	2.19	
<i>LCGN_0844</i>	Multimodular transpeptidase-transglycosylase / Penicillin-bi ing protein 1A/1B (PBP1)	2.26	
<i>LCGN_0845</i>	SA9H10L	2.46	
<i>LCGN_0921</i>	ABC transporter permease protein	2.36	
<i>LCGN_0936</i>	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate--L-lysine ligase		2.74
<i>LCGN_1001</i>	hypothetical protein	0.40	
<i>LCGN_1036</i>	Transporter	0.44	
<i>LCGN_1078</i>	hypothetical protein	0.39	
<i>gpsB</i>	Cell division protein GpsB coordinates the switch between cyli rical a septal cell wall synthesis by re-localization of PBP1	0.45	
<i>LCGN_1115</i>	hypothetical protein	0.52	
<i>LCGN_1181</i>	hypothetical protein	0.40	
<i>LCGN_1229</i>	hypothetical protein	0.33	0.40
<i>LCGN_1248</i>	hypothetical protein	2.49	3.38
<i>mscL</i>	Large-co uctance mechanosensitive channel	0.45	
<i>LCGN_1407</i>	Lipoteichoic acid synthase LtaS Type IIb	2.55	3.22
<i>LCGN_1408</i>	hypothetical protein	2.68	
<i>LCGN_1409</i>	hypothetical protein	2.38	
<i>LCGN_1438</i>	hypothetical protein	0.37	
<i>LCGN_1450</i>	Aspartate carbamoyltransferase	0.24	0.17
<i>LCGN_1470</i>	Glucosamine-6-phosphate deaminase	0.51	
<i>LCGN_1531</i>	Nitritotriacetate monooxygenase component B	0.23	0.26
<i>LCGN_1577</i>	ImpB/MucB/SamB family protein	1.95	
<i>LCGN_1592</i>	Ribosomal large subunit pseudouridine synthase B	2.36	
<i>LCGN_1647</i>	Nitroreductase family protein	0.24	0.26
<i>ileS</i>	Isoleucyl-tRNA synthetase	2.20	
<i>LCGN_1707</i>	hypothetical protein	0.53	
<i>LCGN_1747</i>	hypothetical protein	0.31	0.38
<i>LCGN_1886</i>	Oxygen-insensitive NAD(P)H nitroreductase / Dihydropteridine reductase	0.29	
<i>LCGN_1928</i>	L-proline glycine betaine bi ing ABC transporter protein ProX / Osmotic adaptation	1.95	2.59

(D) Other genes differentially expressed exclusively in co-culture.

Name	Description	ratio of gene expression in co-culture under the high / low aeration level		
		DESeq	DESeq2	EdgeR
LCGN_0029	hypothetical protein		1.99	
LCGN_0030	S4-domain-containing heat shock protein%3B S4-domain-containing heat shock protein	2.84	2.77	
LCGN_0055	Signal peptidase I		0.52	
LCGN_0071	hypothetical protein		0.32	
LCGN_0073	hypothetical protein		2.03	
LCGN_0080	Glycosyltransferase LafB responsible for the formation of Gal-Glc-DAG		0.43	
LCGN_0084	Preprotein translocase subunit YajC	2.87	2.70	
LCGN_0104	6-phosphogluconate dehydrogenase decarboxylating		0.40	
LCGN_0157	Glycine betaine ABC transport system ATP-binding protein OpuAA	0.27	0.28	0.29
LCGN_0195	Flagellar hook-length control protein FliK		0.49	
LCGN_0231	Rrf2 family transcriptional regulator group III		0.60	
LCGN_0275	hypothetical protein		0.51	
LCGN_0317	Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase		2.09	
LCGN_0382	Similar to tetracycline resistance protein		0.23	
LCGN_0383	Phosphopentomutase		0.52	
LCGN_0384	hypothetical protein		0.53	
LCGN_0385	Purine nucleoside phosphorylase		0.58	
LCGN_0403	hypothetical protein		0.49	
LCGN_0416	Cardiolipin synthetase		0.54	
LCGN_0421	ABC-type multidrug transport system ATPase component		0.27	0.29
LCGN_0422	ABC transporter permease protein		0.41	
LCGN_0423	CysteinyI-tRNA synthetase related protein		0.55	
LCGN_0437	LSU ribosomal protein L27p		0.57	
LCGN_0453	hypothetical protein		0.52	
LCGN_0477	unknown		0.46	
LCGN_0501	hypothetical protein		1.95	
LCGN_0580	Cold shock protein		2.40	2.82
LCGN_0627	proposed amino acid ligase fou clustered with an amidotransferase		2.02	
<i>fabI</i>	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH]		0.55	
LCGN_0700	Inner membrane protein translocase component YidC short form Oxal-like		2.14	
LCGN_0703	Oxidoreductase aldo/keto reductase family		2.03	
LCGN_0709	Aspartyl-tRNA(Asn) amidotransferase subunit C @ Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit C		2.23	
LCGN_0713	Cold shock protein	2.75	2.61	
<i>dut</i>	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase	2.61	2.53	
LCGN_0734	hypothetical protein		0.44	
LCGN_0833	ATP-dependent RNA helicase YqfR		1.80	
<i>ptcB</i>	PTS system cellobiose-specific IIB component		1.70	1.99

LCGN_0886	Inositol-1-monophosphatase		0.48	
LCGN_0889	Cell division trigger factor		2.04	2.31
LCGN_0931	hypothetical protein			2.08
LCGN_0941	Neutral e opeptidase O			2.31
LCGN_0968	fibronectin-bi ing protein homolog		0.44	
dacA / dacB	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase		0.45	
LCGN_0972	hypothetical protein		0.47	
fruR	Transcriptional repressor of the fructose operon DeoR family		0.20	
fruC	Tagatose-6-phosphate kinase / 1-phosphofructokinase		0.19	
fruA	PTS system fructose-specific IIA component / PTS system fructose-specific IIB component		0.21	
	/ PTS system fructose-specific IIC component			
fer	Ferredoxin			4.43
LCGN_1100	Cold shock protein		2.42	2.89
aroD	3-dehydroquinate dehydratase I		0.51	
LCGN_1157	hypothetical protein		0.19	
LCGN_1182	unknown		0.20	
LCGN_1183	hypothetical protein		0.20	
LCGN_1237	NAD(FAD)-utilizing dehydrogenase sl0175 homolog		0.54	
LCGN_1247	hypothetical protein		0.53	
LCGN_1262	hypothetical protein		0.49	
LCGN_1276	Phosphoglycerate mutase		1.62	
LCGN_1278	transcription regulator		1.64	
LCGN_1418	Alpha/beta hydrolase fold		1.94	
LCGN_1430	Isoaspartyl aminopeptidase @ Asp-X dipeptidase		2.07	
LCGN_1446	Gluconate permease Bsu4004 homolog		0.48	
LCGN_1452	Substrate-specific component BioY of biotin ECF transporter	0.34	0.35	
LCGN_1475	hypothetical protein	0.20		0.22
LCGN_1568	hypothetical protein		2.30	
LCGN_1572	CBS domain protein Imo1865 homolog		2.19	
LCGN_1581	50S ribosomal subunit maturation GTPase RbgA (B. subtilis YlqF)		2.22	
LCGN_1598	Dihydrofolate reductase		1.68	
LCGN_1600	ATP-depe ent Clp protease ATP-bi ing subunit ClpX		1.70	
engB	GTP-bi ing protein EngB		1.84	
LCGN_1602	Dihydroneopterin aldolase		2.31	
LCGN_1673	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase B		1.91	
LCGN_1688	FtsZ-interacting protein related to cell division		1.81	
cysS	CysteinyI-tRNA synthetase		1.99	
LCGN_1706	COG1939: Ribonuclease III family protein		2.20	
LCGN_1716	hypothetical protein		0.54	
LCGN_1728	Hydrolase HAD subfamily IIIA		0.47	
argS	ArginyI-tRNA synthetase		0.56	
LCGN_1784	UPF0348 protein family		1.62	
pheS	PhenylalanyI-tRNA synthetase alpha chain		2.33	

<i>LCGN_1796</i>	hypothetical protein	0.46	
<i>LCGN_1804</i>	Zinc protease	0.55	
<i>LCGN_1813</i>	Lactose a galactose permease GPH translocator family	3.39	4.15
<i>LCGN_1865</i>	Lipid A export ATP-binding/permease protein MsbA	1.63	

Antagonisme de *Lactococcus garvieae* vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* : étude physiologique et transcriptomique des mécanismes

Parmi les stratégies visant à contrôler la croissance de microorganismes pathogènes dans un aliment, la biopréservation qui s'appuie sur l'utilisation des capacités inhibitrices d'autres microorganismes offre une grande diversité d'opportunités. Il est cependant nécessaire de comprendre les mécanismes moléculaires et physiologiques régissant l'antagonisme du microorganisme protecteur vis-à-vis de la bactérie indésirable. L'objectif de cette thèse était de caractériser l'antagonisme de *L. garvieae* N201, isolé de fromage, vis-à-vis de souches de *S. aureus* par des approches *in vitro* : génomique, transcriptomique (ciblée concernant *S. aureus*, globale concernant *L. garvieae*) et phénotypique. Un acteur avait déjà été identifié : le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) produit par *L. garvieae* sous un niveau d'aération élevé. Lors de ces travaux de thèse, il a été montré que le peroxyde d'hydrogène serait également produit par *L. garvieae* sous une faible aération en quantité faible (indéetectable par spectrophotométrie) mais suffisante pour induire une inhibition de *S. aureus*. Les gènes de production du H_2O_2 de *L. garvieae* (*poxB*, *sodA*) seraient exprimés constitutivement quel que soit le niveau d'aération. Les gènes de dégradation du H_2O_2 (*katA*, *sodA*, *ahpC* / *ahpF*) seraient plutôt surexprimés sous une faible aération, suggérant leur rôle dans un mode de contrôle de la concentration en H_2O_2 autogène par *L. garvieae*. En parallèle, trois autres mécanismes potentiellement impliqués dans l'antagonisme ont été mis en évidence : i) la répression de gènes de réponse au stress (*clpC*, *ctsR*, *dnaK*) de *S. aureus* par *L. garvieae* et l'aération, ii) la répression de gènes de division cellulaire de *S. aureus* (*mraZ*, *mraW*, potentiellement le cluster *dcw*) par *L. garvieae*, iii) la production d'un effecteur extracellulaire par *L. garvieae* dont la nature reste à caractériser. Ajouté à cela, la présence de *L. garvieae* modulerait l'expression des principaux gènes de virulence de *S. aureus*, réprimant ceux codant pour les entérotoxines sous une faible aération. Ainsi, la souche *L. garvieae* N201 s'est révélée être une candidate intéressante comme agent de biopréservation. Cependant, son innocuité pour l'Homme devra être vérifiée et son antagonisme sur *S. aureus* devra être évalué en matrice alimentaire. Les données générées ainsi que la démarche développée pourront être utilisées afin d'étudier des interactions entre d'autres espèces d'intérêt et dans des écosystèmes différents.

***Lactococcus garvieae* antagonism against *Staphylococcus aureus* : physiological and transcriptomic studies of the mechanisms**

Among strategies aiming to control the growth of spoilage microorganisms in food, the biopreservation is based on the inhibitory capacities of other microorganisms and presents a considerable variety of opportunities. A good understanding of the molecular and physiologic mechanisms underlying the antagonism of the preservative microorganism against the spoilage bacterium is also required. This thesis aimed to characterize the antagonism of *L. garvieae* N201 dairy strain against *S. aureus* strains combining *in vitro* strategies: genomic, transcriptomic (targeted concerning *S. aureus*, global concerning *L. garvieae*) and phenotypic. The involvement of hydrogen peroxide (H_2O_2) produced by *L. garvieae* under high aeration was already known. Although H_2O_2 concentration was undetectable using spectrophotometry method, it was produced by *L. garvieae* under low aeration at sufficient concentration to induce *S. aureus* inhibition. *L. garvieae* H_2O_2 -synthesis genes (*poxB*, *sodA*) seemed constitutively expressed whatever the aeration level. *L. garvieae* H_2O_2 -degradation (*katA*, *sodA*, *ahpC* / *ahpF*) genes were overexpressed under low aeration, suggesting their involvement in control of autogenous H_2O_2 level. In parallel, three other mechanisms may be involved in this antagonistic relationship: i) the repression of *S. aureus* stress-response genes (*clpC*, *ctsR*, *dnaK*) by *L. garvieae* and / or under high aeration, ii) the repression of *S. aureus* cell-division genes (*mraZ*, *mraW* and probably the *dcw* cluster) by *L. garvieae*, iii), the production by *L. garvieae* of an extracellular effector which has to be characterized. Additionally, *L. garvieae* can modulate the expression of *S. aureus* major virulence genes, repressing those coding for enterotoxins under low aeration. Thus, *L. garvieae* N201 turned out to be an interesting candidate for biopreservative applications. However, its safety for humans should be approved and its antagonism against *S. aureus* has to be investigated in food matrices. The data resulting from this work may be used to study other interactions between other valuable species and in other ecosystems.

Mots-clefs (Keywords) : *Staphylococcus aureus*, *Lactococcus garvieae*, antagonisme (antagonism) peroxyde d'hydrogène (hydrogen peroxide), RNA sequencing.
